

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

**MODIFICATIONS
DE LA RÉACTIVITÉ DU LAPIN (ALLERGIE)
DÉTERMINÉES PAR LES INOCULATIONS
SOUS-CUTANÉES
DE STREPTOCOCCUS PYOGENES (GROUPE A)**

I. — MÉTHODES, EFFET DES PRIMO-INOCULATIONS

par R. WAHL et G. DRACH (*) (**)

(*Institut Pasteur*)

Nous avons constaté (Drach [3]) que l'inoculation sous-cutanée de streptocoques vivants du groupe A (*Streptococcus pyogenes*), en quantité appropriée, déterminait chez les lapins, après un certain délai, un état particulier qui se traduisait d'une part par une réactivité cutanée de type retardé à l'injection intradermique de certains produits bactériens et d'autre part, lors des réinoculations par la même voie, par des réactions locales et générales variables, mais différant toujours de celles qu'avait provoquées la primo-inoculation.

Nous décrirons ces réactions et nous discuterons les relations qui pourraient exister entre ces manifestations complexes et une éventuelle « allergie streptococcique ».

(*) Manuscrit reçu le 24 mars 1961.

(**) Ce travail a été fait avec l'aide d'une subvention de la Fondation Waksman pour le développement des Etudes Microbiologiques en France.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Trois souches de streptocoques ont été utilisées pour les inoculations. La souche I (A 305, du type 12). Elle nous a été transmise par Raska. Elle avait été isolée par Reed et Matheson [8] de la gorge d'un néphrétique. Elle est actuellement peu virulente : elle l'a été beaucoup plus dans les expériences de Reed, car il faut actuellement, pour produire un abcès chez le lapin, une dose cent fois plus forte que celle que Reed et Matheson ont utilisée dans le même but. Cette souche a été aussi utilisée après augmentation de sa virulence pour le lapin par passages d'abcès à abcès chez cet animal (cette augmentation était faible).

La souche II (A 18, du type 24) a été utilisée soit à l'état moyennement virulent, soit après exaltation de sa virulence pour la souris par passages par cet animal (on est arrivé à la dose létale de 0,5 ml de la dilution 10⁻⁶). Sa virulence pour le lapin avait augmenté en même temps. Dans cet état elle sera désignée comme S. II vir.

La souche III (A 23, du type 23) était de virulence intermédiaire entre celles des souches I et II.

*La réactivité cutanée a été explorée avec des filtrats de cultures de diverses souches de différents types du groupe A (types 12, 14, 25, 26, 27, 28 et 33) et d'autres espèces bactériennes (streptocoques ou autres) : 3 souches de streptocoques du groupe C, 1 souche des groupes B, D, F, G, H, 1 de *Str. mitis*, 1 de *Staph. pyogenes* et 1 d'*E. coli*.*

Les inoculations sont faites par voie sous-cutanée dans la région dorsale préalablement rasée, avec des bactéries vivantes, généralement d'une culture de 18 h, parfois d'une culture de 5 h, en bouillon à l'extrait de viande peptoné, glucosé, tamponné, centrifugées et remises en suspension dans de l'eau physiologique. On pratique soit une seule inoculation, soit plusieurs. Dans ce second cas, on réinocule généralement la même souche, parfois une autre.

Plusieurs doses ont été utilisées, suivant la virulence de la souche et le poids du lapin :

La dose standard (D. 1/1) : suspension contenant les bactéries de 10 ml de culture dans 1 ml d'eau physiologique.

Le centième de la dose standard (D. 1/100) : les bactéries de 0,1 ml de culture sous le volume de 0,1 ml.

Le dixième de la dose standard (D. 1/10) : les bactéries de 1 ml sous le volume de 0,1 ml.

Le cinquième de la dose standard (D. 1/5) : les bactéries de 2 ml sous le volume de 0,1 ml.

La moitié de la dose standard (D. 1/2) : les bactéries de 5 ml sous un volume de 1 ml.

Le double de la dose standard (D. 2/1) : les bactéries de 20 ml sous un volume de 2 ml.

On a induit la réactivité cutanée par d'autres méthodes, qui n'ont pas été pratiquées sur une grande échelle, parce que moins satisfaisantes : injections intradermiques de bactéries vivantes, de broyats de bactéries. Les injections de filtrats de cultures n'ont pas provoqué l'apparition de la réactivité cutanée.

PRÉPARATIONS DÉTECTRICES DE LA RÉACTIVITÉ CUTANÉE.

Le plus souvent on a exploré la réactivité cutanée en injectant dans le derme le surnageant d'une culture de 18 h après centrifugation dans une centrifugeuse réfrigérée, stérilisation soit par le chloroforme, soit par filtration sur celite et neutralisation par du bicarbonate de sodium à 10 p. 100.

STÉRILISATION PAR LE CHLOROFORME. — Le surnageant est soumis à l'agitation électromagnétique pendant quatre heures à + 4°. On laisse reposer, on décante et on achève d'éliminer le chloroforme par le vide pendant une heure.

STRÉRILISATION PAR FILTRATION SUR CELITE. — Deux filtrations stérilisent en général le produit. Parfois il en a fallu trois ou quatre.

La stérilité est contrôlée par ensemencement.

La conservation des filtrats en flacons bouchés à + 4° a donné d'aussi bons résultats que la conservation en ampoules scellées à - 18°.

QUELQUES PROPRIÉTÉS DE LA SUBSTANCE DÉTECTRICE.

PRÉCIPITATION PAR L'ACIDE TRICHLOROACÉTIQUE. — Trois volumes sont précipités par un volume d'acide trichloroacétique. Le précipité redissous dans l'eau physiologique et neutralisé contient la substance détectrice de la réactivité cutanée (S. D.).

PRÉCIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM. — Les précipités à 50, 60 et 75 p. 100 de sulfate d'ammonium, redissous, dialysés contre eau distillée, puis contre eau physiologique, ajustés à pH 7, donnent chez les lapins allergiques une papule, mais non entourée d'érythème.

RÉSISTANCE A LA CHALEUR. — L'activité des filtrats résiste à 37° pendant quarante-huit heures et à 100° pendant dix minutes.

RÉSISTANCE A LA TRYPSINE. — L'activité résiste partiellement à l'action de 0,5 p. 100 de trypsine pendant deux heures, suivie de dix minutes de chauffage à 100°.

Il est possible que la S. D. purifiée n'ait pas la même résistance.

DÉTECTION DE LA RÉACTIVITÉ CUTANÉE.

Elle est faite par injection intradermique de 0,1 ml de filtrat convenablement dilué. Les dilutions à utiliser ont été déterminées par des injections intradermiques à des lapins neufs de filtrats de S. I, non

dilués et à des dilutions de 10^{-1} à 10^{-5} , et de bouillon non ensemencé aux mêmes dilutions.

L'injection de bouillon non dilué produit une papule qui se résorbe lentement sans érythème.

Tous les lapins réagissent aux filtrats non dilués par un érythème et une papule et quelques-uns réagissent à la dilution de 10^{-2} par un érythème discret sans papule, qui disparaît en vingt-quatre à quarante-huit heures. Ces réactions sont probablement dues aux différentes toxines des filtrats.

Les dilutions à 10^{-3} et davantage ne provoquent pas de réaction chez la plupart des lapins neufs adultes, mais non chez tous. Au contraire, les jeunes lapins réagissent souvent à cette dilution.

L'injection de 0,1 ml de filtrat à 10^{-3} a été adoptée comme épreuve standard chez le lapin adulte, chez qui les expériences ont porté en général. Chez le jeune lapin, il faudrait peut-être envisager de choisir la dilution de 10^{-4} .

Dans certains cas, on complète l'épreuve par des injections intradermiques de 0,1 ml de dilutions à 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} .

La réaction cutanée est une réaction (du type « allergie retardée ») lisible entre dix-huit et vingt-quatre heures.

LES RÉSULTATS SONT NOTÉS DE LA FAÇON SUIVANTE :

- Réaction douteuse = ?, petite tache rose pâle.
- Réaction très faible = ±, petite tache rose de 1 cm de diamètre.
- Réaction faible = +, érythème net de 1 cm de diamètre.
- Réaction moyenne = ++, même érythème avec infiltration au centre.
- Réaction forte = +++, infiltration de 1 cm de diamètre, dépassée par l'érythème.
- Réaction très forte = ++++. Dans ce cas, soit l'érythème, soit la papule centrale dépasse les dimensions ci-dessus. Assez rarement il y a une réaction hémorragique.

Les lapins qui présentent une réaction forte à l'épreuve standard répondent habituellement encore à la dilution de 10^{-5} , plus rarement à la dilution de 10^{-6} .

Ceux qui présentent une réaction moyenne répondent à la dilution de 10^{-4} , ceux qui présentent une réaction faible à la dose standard ne répondent pas aux dilutions plus élevées.

CHOIX DES SOUCHES DÉTECTRICES. — Les filtrats de cultures de certaines souches du groupe A produisent de fortes réactions (+ + ou +++) chez presque tous les lapins. Parmi les quelques souches que nous avons éprouvées, deux souches du type 24 et une souche de chacun des types 25, 26 et 28 (la souche du type 26 a donné des réactions un peu moindres que celles des types 25 et 28) donnaient une réaction fortement positive chez tous les lapins neufs et, à quelques exceptions près, chez les lapins en expérience. Les exceptions concernaient des

lapins en expérience ayant perdu leur réactivité cutanée spécifique et généralement cachectiques. Ces filtrats étaient inutilisables.

On a utilisé les filtrats de souches des types 12, 14, 22, 23 et 33 qui ne donnaient habituellement pas de réaction chez les lapins neufs. Le filtrat du type 27 était également utilisable, ne donnant qu'une réaction limite chez les lapins neufs.

En comparant chez différents animaux « allergisés » par différentes souches, les réactions cutanées provoquées par le filtrat d'une même souche on peut évaluer les intensités relatives de leur réactivité cutanée.

Cette évaluation n'est que relative, car un même animal « allergisé » ne réagit pas avec la même intensité aux filtrats de différentes souches. Ceux des souches des types 14, 23, 27, 33 provoquaient des réponses presque identiques à celui du type 12, mais un peu plus faibles. Celui du type 22, au contraire provoquait des réponses nettement plus fortes.

CHOIX DES LAPINS. — Les lapins utilisés n'étaient pas de race pure ; la plupart étaient à pelage noir, aussi semblables que possible entre eux, et quelques-uns étaient des lapins ordinaires à pelage brun. Ils avaient tous séjourné préalablement dans l'animalerie pendant trois semaines au moins, alimentés avec des biscuits spéciaux et quelques légumes frais. Cette alimentation était continuée pendant toute l'expérimentation.

Par ailleurs (ce qui est signalé par tous les auteurs) certains lapins neufs réagissent à tous les filtrats. Par conséquent, la sensibilité au filtrat utilisé doit être préalablement contrôlée chez tous les lapins à utiliser, par des injections intradermiques d'une dilution de 10^{-3} de filtrat détecteur (peut-être à 10^{-4} chez les jeunes lapins). Ceci a été fait sur 46 lapins : 13 réagissaient à tous les filtrats. On a utilisés pour les expériences les 33 lapins neufs qui ne réagissaient pas et, pour une expérience spéciale, un de ceux qui réagissaient (n° 18). Les 12 autres ont été éliminés.

EXPÉRIMENTATION

I. — RÉACTIONS SPÉCIFIQUES AUX INOCULATIONS SOUS-CUTANÉES DE STREPTOCOQUES VIVANTS CHEZ UN LAPIN NEUF.

Sur les 34 lapins utilisés, 21 pesaient de 4 à 5 kg, 3 pesaient 3 kg, 6 pesaient entre 2 et 3 kg, 4 moins de 2 kg.

Certains des lapins ont reçu une inoculation unique, d'autres des inoculations répétées et rapprochées. On a observé tout ou partie des effets suivants : des *réactions locales au point d'inoculation*, une réponse cutanée positive à l'injection intradermique, des *réactions générales*, des *réactions sous-cutanées à distance*. Les effets dépendent de la dose, de la répétition des inoculations, de la virulence de la souche, de l'âge et de l'état du lapin.

1^o Réactions locales au point d'inoculation.

Nous décrirons successivement les réactions locales d'une part à l'inoculation unique de souches de diverses virulences et, d'autre part, aux inoculations répétées.

A. RÉACTION LOCALE A LA PRIMO-INOCULATION DE LA SOUCHE I (S. I) [PEU VIRULENTE]. — La réaction diffère considérablement suivant le poids et l'âge du lapin.

La souche S. I. peu virulente produit chez un lapin de 4 à 5 kg un abcès torpide, sans réaction générale ; chez un lapin de 3 kg, des réactions locales et générales variables : chez un lapin de moins de 2 kg, des réactions générales mortelles.

Chez les lapins de 4 à 5 kg, les doses de D. 1/5 et inférieures ont donné des réactions nulles ou minimes (les lapins n°s 31 et 32 ont fait un petit abcès, l'un avec D. 1/5, l'autre avec D. 1/10).

Après inoculation de la dose D. 1/1, un abcès torpide s'est développé chez les lapins n°s 4, 5, 6, 22, 26, 27, 28. Le lendemain, le point de l'inoculation était le siège d'un *érythème* qui a persisté deux ou trois jours, puis a disparu, et d'une *infiltration* diffuse sous-jacente, qui s'est accentuée lentement. Vers le quinzième jour, l'infiltration était remplacée par un *nodule*, en général bien limité, régulièrement arrondi, ferme : l'abcès était collecté. Il augmentait de volume pendant un mois environ, puis restait longtemps stationnaire. La ponction ramenait un pus épais, crémeux, blanchâtre, d'aspect caséux. Si elle était faite au début de l'abcès, le pus contenait des streptocoques cultivables, mais jamais en quantité suffisante pour être décelables par l'examen microscopique direct. Le pus était d'autant plus épais que l'abcès était plus ancien.

L'évolution de l'abcès produit par une souche peu virulente était très lente, durant trois à quatre mois, parfois plus longtemps ; il pouvait rester stationnaire jusqu'à la fin ou s'étendre ; puis finalement, ou bien il s'évacuait et se cicatrisait, ou bien il se résorbait sans évacuer.

L'examen histologique (dû à J. Levaditi et à M. Piéchaud) montre que l'abcès consiste au début en un centre de nécrose suppurée (fig. 1) avec polynucléaires et monocytes conglomérés, et finalement une nécrose pseudo-caséuse. Il est entouré d'une zone épaisse de tissu conjonctif jeune très cellulaire. Dans cette zone on voit des plages d'infiltration de cellules rondes de type plasmocytaire (fig. 1 et 2). Une coque conjonctive limite le tout. Pas de germes visibles.

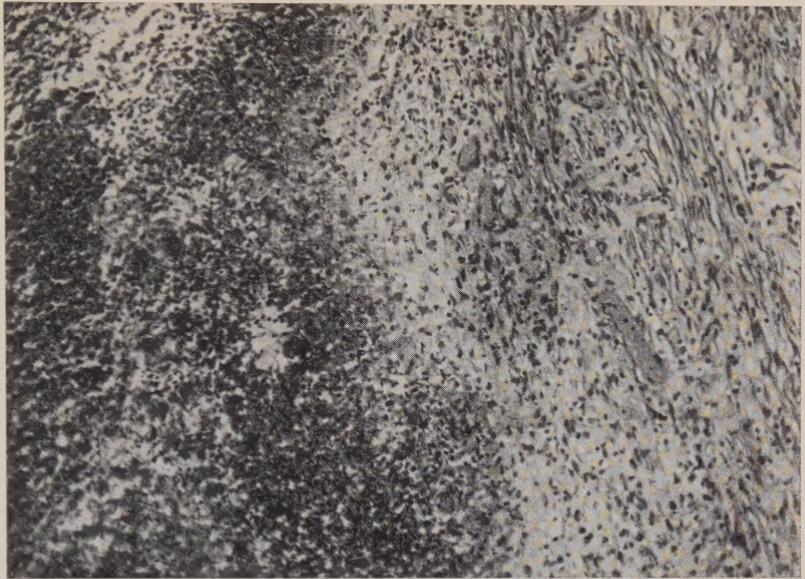


FIG. 1. — Abcès de primo-inoculation. *A gauche*, zone de nécrose ; *à droite*, réaction conjonctive et plasmocytaire.

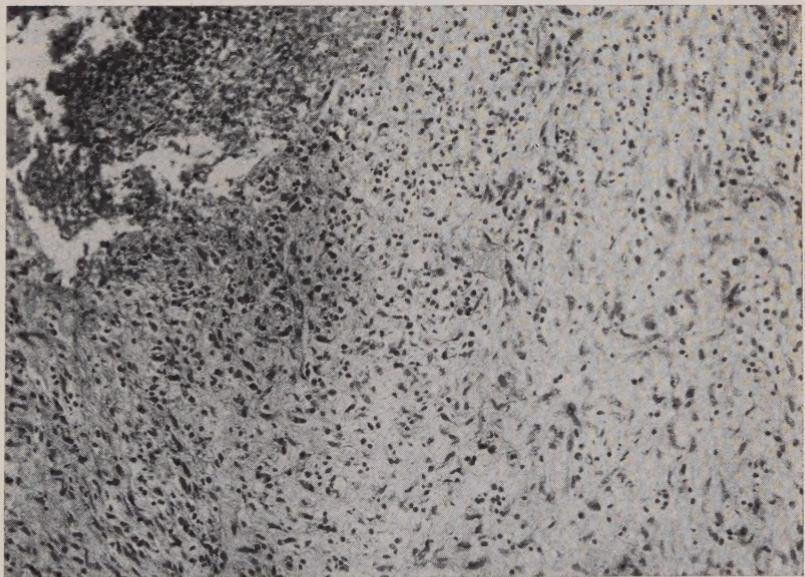


FIG. 2. — Abcès de primo-inoculation. *A gauche*, réaction conjonctive et plasmocytaire ; *à droite*, coque conjonctive.

Les abcès développés à l'endroit d'une inoculation (primo-inoculation et réinoculation) et les nodules et abcès métastatiques, dont nous parlerons plus loin, ont les mêmes caractères.

Chez les lapins de 3 kg, la dose D. 1/10 de S.I. a produit soit une réaction nulle ou discrète, soit des accidents généraux mortels sans réaction locale (n° 35, mort le cinquième jour), soit un petit abcès à évolution rapide (n° 33) sans accidents généraux, soit aucune réaction (n° 34).

Chez les lapins de moins de 2 kg, la dose D. 1/1 de S. I n'a pas donné de réaction locale mais des accidents généraux mortels, dont nous reparlerons.

B. RÉACTION LOCALE A LA PRIMO-INOCULATION DE SOUCHES DE VIRULENCE MOYENNE. — Les souches de virulence moyenne donnent des abcès plus extensifs avec de petits abcès satellites.

Des souches moyennement virulentes *chez des lapins de 4 à 5 kg* ont donné, à dose égale, des abcès moins bien limités que S. I (peu virulente). Ces abcès avaient une plus grande tendance à émettre des ramifications et à s'étendre de proche en proche.

C'était le cas de la souche III (S. III) chez les lapins n°s 2, 13 et 29.

S. I elle-même, rendue moyennement virulente par des passages en série chez des lapins, avec reprise du pus de l'abcès, a produit chez les n°s 4, 5 et 6 (de 4 à 5 kg) des abcès à tendance extensive avec de petits abcès satellites ; chez le n° 19 un placard érysipéloïde sous lequel s'est produit un petit abcès.

Les souches de virulence moyenne n'ont pas été inoculées aux lapins de 3 kg et au-dessous.

C. RÉACTION LOCALE A L'INOCULATION DE LA SOUCHE II (S. II) VIRULENTE. — La souche S. II, virulente, a produit des réactions locales analogues à celles des souches de virulence moyenne, mais plus accentuées. Rendue encore plus virulente par passages par la souris, elle tuait les lapins, même les plus gros, sans réaction locale.

Les doses D. 1/10 ou D. 1/5 de la souche II ont produit, chez les lapins entre 2 et 3 kg, des réactions locales à évolution rapide, avec parfois des éruptions scarlatiniformes. Ces réactions étaient de trois types différents : de grands abcès aigus, des réactions inflammatoires, des abcès plus discrets, mais toujours aigus.

Des abcès aigus très inflammatoires ont été observés chez deux jeunes lapins ayant reçu D. 1/10. L'un (n° 36) a présenté d'abord un placard infiltré rouge foncé à centre nécrotique (mais sans bourrelet) qui est apparu le quatrième jour et une éruption scar-

latiniforme le cinquième jour. Au bout de quinze jours, un grand abcès dur, multilobé, s'est constitué ; il s'est fistulisé vers le cinquantième jour et il était cicatrisé le soixantième jour.

Chez l'autre (n° 39) un abcès extensif s'est développé rapidement. Il s'est ouvert le treizième jour par une véritable ulcération à l'emporte-pièce, tandis qu'un second abcès encore petit s'était constitué à côté du premier. Le premier abcès était guéri le trente-cinquième jour. Le second abcès s'était étendu et le quarante-quatrième jour existait un groupe d'abcès reliés par des cordons durs. Les abcès étaient résorbés le quatre-vingt-dixième jour.

Une réaction locale inflammatoire, sans abcès, avec éruption scarlatiniforme a été observée chez le lapin n° 38 ayant reçu D. 1/5 de S. II.

Un abcès plus ou moins discret, mais toujours à évolution rapide s'est produit dans d'autres cas. Chez le n° 37, avec D. 1/10 de la souche II, un abcès de la taille d'un petit pois s'est constitué le quatrième jour, a augmenté et le quinzième jour, c'était un grand abcès multilobé. Une seconde injection de D. 1/5 n'a pas donné de réaction locale (dix-huit jours après) mais a déclenché une cachexie. Le n° 40 (D. 1/5) a présenté un très petit abcès qui s'est vidé rapidement. Il s'est cicatrisé le trente-cinquième jour et il était complètement guéri le quarante-cinquième jour.

S. II rendue très virulente pour la souris (dose létale, 0,5 ml à la dilution de 10⁻⁶) a été inoculée en culture de cinq heures (plus pathogène que la culture de dix-huit heures) à la dose de D. 1/1 à un lapin de 4,5 kg (n° 14) qui est mort le lendemain.

D. RÉACTIONS LOCALES A PLUSIEURS INOCULATIONS PRATIQUÉES AVANT LA CONSTITUTION DE LA RÉACTIVITÉ CUTANÉE. — Comme dans le cas d'une inoculation unique, les réactions locales dépendent de la virulence de la souche, des doses injectées et du poids du lapin.

Mais les réactions aux inoculations successives diffèrent des réactions aux inoculations qui les ont précédées, du fait de l'influence de celles-ci, laquelle varie avec l'intervalle qui les en sépare et avec les quantités inoculées.

Nos expériences ne concernaient que les trois cas suivants parmi tous les cas possibles.

a) *Quand les doses étaient égales entre elles et les inoculations très rapprochées, les réactions locales aux inoculations successives étaient peu influencées par les inoculations antérieures.* — Deux lapins de 5 kg ont reçu chacun, à trois ou quatre jours

d'intervalle, 3 injections égales entre elles de la souche I peu virulente, à la dose D. 1/5 pour le n° 31 et de D. 1/2 pour le n° 32, doses faibles relativement au peu de virulence de la souche et aux poids des lapins. Les réactions, minimales, ont été sensiblement les mêmes : un abcès à chaque inoculation chez le n° 31, et à la première et la troisième inoculation chez le n° 32. La deuxième inoculation a donné chez le n° 32 une réaction inflammatoire sans abcès. Tous ces abcès eurent une évolution parallèle, se sont résorbés sans s'ouvrir en deux mois et demi. Le troisième abcès chez les deux lapins était un peu plus petit que les autres.

b) *Quand les doses étaient croissantes et les inoculations très rapprochées, les réactions locales aux inoculations successives étaient renforcées.* — Le lapin n° 2 de 5 kg a reçu d'abord D. 1/100 de la souche III moyennement virulente et successivement D. 1/10 cinq jours après et D. 1/1 six jours après. Les doses D. 1/100 et D. 1/10 ont donné un érythème fugace ; la dose D. 1/1 a donné un abcès constitué en quinze jours, d'abord bien limité, puis extensif avec des ramifications, des cordons et des nodules à distance.

Le n° 3 a reçu D. 1/100 de la souche I et D. 1/1 de la même souche trois jours après. Il a fait des réactions minimales avec la première dose ; la dose D. 1/1 a donné un très grand abcès (qui contenait par exception des streptocoques vivants) constitué en sept jours. La dose D. 1/10 de la souche III, inoculée six semaines après la première, a donné une réaction inflammatoire et des nodules à distance.

c) *Quand les doses étaient croissantes et les inoculations éloignées, les réactions locales aux inoculations successives étaient plus faibles que celles produites par la primo-inoculation.* — Elles étaient soit atténées, soit nulles.

Il s'agit de cas où la première inoculation n'avait pas induit la réactivité cutanée dans les délais habituels.

Le n° 34 (2,8 kg) a reçu une première inoculation de D. 1/10 de S. I. Il n'a pas fait de réaction locale ni générale. Le n° 37 S. II étant plus virulente que S. I. Chacun a été réinoculé au bout de dix-huit jours avec D. 1/5 de sa souche respective, sans réaction locale.

Le n° 36 (2,5 kg) a reçu D. 1/10 de S. II, qui a donné un grand abcès aigu avec éruption scarlatiniforme. Cet abcès s'est ouvert en une semaine et s'est entouré de petits abcès satellites qui se sont ouverts à leur tour. Une réinoculation vingt-cinq jours plus tard avec D. 1/5 de S. I a provoqué un très petit abcès très tardif, vingt-huit jours après la réinoculation. Le n° 33 (2,8 kg) a reçu D. 1/10 de S. I, qui a donné un abcès torpide moyen,

constitué le douzième jour et qui s'est résorbé après six semaines. Il a été réinoculé le vingt-cinquième jour avec D. 1/5 de la même souche et n'a pas fait de réaction locale.

L'inoculation à un jeune lapin (le n° 10 de 1,5 kg) de D. 1/100 de S. I. à laquelle il n'a pas réagi, lui a permis de supporter quatorze jours après la dose de D. 1/10 de la même souche, qui a produit un abcès moyen, alors que la même dose a tué deux lapins neufs de même poids.

2^o Réactivité cutanée (intradermoréactions).

Pour rendre compte de l'effet déterminant des inoculations sous-cutanées sur la réactivité cutanée, nous définirons les « *doses allergisantes* ».

Nous appellerons ainsi les nombres de bactéries qui, en injection sous-cutanée, déterminent régulièrement et sans donner de réactions générales, une réactivité cutanée, mise en évidence par l'injection intradermique d'un filtrat de culture de streptocoques.

Les doses supérieures aux doses « allergisantes » sont celles qui donnent des réactions générales, souvent avec mort du lapin. Si le lapin survit, elles donnent un abcès aigu et la réactivité cutanée se constitue.

Les doses inférieures aux doses « allergisantes » produisent une réaction locale minime ou nulle et pas de réactivité cutanée.

Les doses « allergisantes » produisent une réaction locale au point d'inoculation, presque toujours un abcès. Les doses « allergisantes » varient, comme la réaction locale au point d'inoculation avec :

a) le poids et l'âge du lapin ;

b) la virulence de la souche ;

c) le nombre d'inoculations déterminantes (inoculation unique ou inoculations répétées).

Nous ne savons pas encore si le type sérologique de la souche a une influence, c'est-à-dire si les souches de certains types sont, à virulence égale, et à la même dose plus « allergisantes » que d'autres.

A. LES DOSES ALLERGISANTES. — L'établissement de la réactivité cutanée a été obtenu tantôt par une, tantôt par deux ou trois inoculations.

Les doses allergisantes, en inoculation unique, de S. I., sont les suivantes :

Chez le lapin de 4 à 5 kg, se sont celles qui produisent un abcès, c'est-à-dire soit D. 1/1, soit D. 2/1. Ainsi la réactivité

cutanée a été induite chez les lapins n°s 4, 5, 6 et 27 avec la dose D. 1/1 et chez le n° 30 avec D. 2/1.

Pour un lapin de 3 kg, la dose D. 1/1 paraît à la limite de la dose « allergisante ». En effet, elle a bien induit la réactivité cutanée chez le lapin n° 19, mais il l'a assez mal tolérée car il a fait une réaction très forte. La dose D. 1/10 était cependant trop faible pour un lapin de 3 kg, car elle n'a pas provoqué de réactivité cutanée chez le n° 33 (petits abcès et réactivité cutanée fugace) et chez le n° 34 (pas de réaction locale et réactivité cutanée nulle).

On n'a pas essayé d'allergiser des lapins de 2 à 3 kg avec S. I.

Des lapins au-dessous de 2 kg ont été inoculés avec S. I, le n° 9 avec D. 1/1, le n° 8 avec D. 1/10, le n° 10 avec D. 1/100. Les deux premiers ont succombé, le troisième n'a pas présenté une réactivité cutanée nette.

Les doses allergisantes de la souche S. II sont plus petites :

Pour les lapins de 4 à 5 kg, ou de 3 kg, elles n'ont pas été déterminées. Un seul lapin de 4 à 5 kg a reçu, comme nous l'avons vu, D. 1/1 de la souche à l'état très virulent et il a succombé.

Pour les lapins de 2 à 3 kg, les doses « allergisantes » de S. II sont aux environs de D. 1/10 ou de D. 1/5 ou de D. 1/2, suivant le poids du lapin et la virulence de la souche. Tantôt une inoculation suffit, tantôt il en faut deux.

On a induit la réactivité cutanée chez trois lapins par une seule inoculation de S. II : le n° 39 (2,3 kg) avec D. 1/10 ; les n°s 38 et 40 (de 2,5 à 2,8 kg) avec D. 1/5. Les lapins n°s 36 et 37 (inoculés avec D. 1/10 de S. II) auraient probablement développé la réactivité cutanée de la même façon mais ils ont été réinoculés le dix-huitième jour, c'est-à-dire avant l'apparition de celle-ci. Par contre, la dose de D. 1/10 de S. I était à la limite inférieure de la dose « allergisante » car chez les n°s 33 et 34 (2,9 kg) elle a provoqué une réaction faible et fugace. Pour le n° 33, la réactivité cutanée était + ± le dixième jour et avait disparu le quinzième jour.

B. CARACTÈRES DE LA RÉACTIVITÉ CUTANÉE OBTENUE PAR INOCULATION UNIQUE. — a) *Délai d'apparition de la réactivité cutanée.* — La réactivité cutanée apparaît après une période de latence, toujours à peu près dans les mêmes délais, quels que soient la dose inculée, le poids du lapin et la virulence de la souche (à condition que la dose soit « allergisante », c'est-à-dire appropriée au poids du lapin et à la virulence de la souche).

Quinze lapins ont été « allergisés » par inoculation unique. La première intradermo-réaction était pratiquée le huitième, le

neuvième ou le dixième jour. Elle a été négative chez tous les lapins, sauf le n° 3 inoculé avec D. 1/100, puis D. 1/1 de S. I. Elle était positive le quinzième jour chez 14 lapins sur 15 (le quinzième était le n° 3 dont la réaction était redevenue négative).

Ces 14 lapins comprenaient :

Six lapins de 4 à 5 kg inoculés avec D. 1/1 de S. I (peu virulente) [n°s 27, 28, 26, 22, 4 et 5] qui avaient au quinzième jour une réactivité cutanée faible (+ ou ±).

Deux lapins de 3 kg (n°s 19 et 34) inoculés avec S. I, qui avaient également une réactivité cutanée faible : le n° 19 inoculé avec D. 1/1 avait + et le n° 34 inoculé avec D. 1/10 avait ±.

Un lapin de 4,8 kg inoculé avec D. 2/1 de S. I qui avait une réactivité cutanée forte (+++).

Trois lapins de 2 à 3 kg (n°s 38, 39, 40) qui avaient reçu S. II ; le n° 39 à la dose de D. 1/10, les deux autres à la dose de D. 1/5. L'intradémo-réaction était positive le vingt-cinquième jour, à des degrés différents : ± chez le n° 39, + chez le n° 38 et +++ chez le n° 40.

On voit qu'au moment où elle apparaissait, la réactivité cutanée était encore assez faible, sauf chez deux lapins dont l'un avait reçu une dose plus forte de S. I et l'autre S. II virulente (cependant la même S. II n'a pas produit le même effet chez deux autres lapins semblables).

b) *Evolution de la réactivité cutanée après inoculation unique.* — Nous envisageons ici, d'une part l'évolution de la réactivité cutanée chez les lapins qui n'ont pas été réinoculés et, d'autre part, chez ceux qui ont été réinoculés assez tardivement pour qu'on ait pu suivre l'évolution un certain temps avant la réinoculation.

Deux lapins de 4 à 5 kg (n°s 27 et 30) et un de 3 kg (n° 19) inoculés avec S. I ont été suivis pendant quarante-cinq à soixante-sept jours. La réactivité cutanée augmentait assez rapidement avec un maximum vers le vingt-cinquième ou le trentième jour. Chez le n° 30, la réactivité cutanée avait disparu le cinquantième jour. Chez les deux autres elle se montrait faible (+) respectivement au quarante-cinquième et au soixante-septième jour. Les trois lapins ont été réinoculés l'un le quarante-cinquième jour, les deux autres le soixante-septième jour, de sorte que l'évolution spontanée n'a pas pu être suivie plus longtemps.

Le n° 6, inoculé avec D 1/1 de S. I n'a pas, pour des raisons fortuites, été suivi pendant les six premiers mois. Au bout de six mois, il avait encore ++. Ensuite il a été réinoculé.

Les 3 lapins (n°s 38, 39, 40) de 2 à 3 kg, « allergisés » par S. II ont présenté une réaction cutanée forte +++ dès le vingt-cin-

quième jour. Deux d'entre eux ont conservé très longtemps une réactivité cutanée positive. Chez l'un (n° 39), elle était encore +++ le deux cent vingt-deuxième jour et ++ le deux cent quarante-sixième jour, chez l'autre (n° 38) elle était encore +++ le cinquante-septième jour, mais ce dernier a présenté les accidents généraux dont nous parlerons plus loin, tandis que sa réactivité cutanée baissait. La réactivité cutanée du n° 38 a ensuite présenté des fluctuations en fonction de l'état général. Elle a été suivie jusqu'au deux cent cinquante-neuvième jour. Le n° 40 avait +++ le vingt-cinquième jour, puis la réactivité cutanée a présenté des fluctuations jusqu'à ce qu'elle devienne négative le cinquantième jour, le lapin s'est cachectisé et il est mort le soixante-quinzième jour.

On voit que l'intensité de la réactivité cutanée, qui était généralement faible le quinzième jour (sauf deux exceptions), augmente assez vite et atteint un maximum qui paraît se situer entre le vingt-cinquième et le quarantième jour : puis elle décroît plus ou moins rapidement. Ensuite, tantôt elle devient négative entre le soixante-cinquième et le soixante-quinzième jour, tantôt elle reste positive pendant très longtemps et à niveau variable (très élevé pour le n° 39, très bas pour le n° 38). Il semble que la S. II, plus virulente produise une réactivité cutanée qui, bien qu'apparaissant dans les mêmes délais, augmente plus rapidement d'intensité et atteint un maximum plus élevé que ne le fait la S. I, peu virulente. C'est ce qui a été constaté chez deux lapins sur trois injectés avec cette souche.

Par contre, le temps pendant lequel la réactivité cutanée persiste paraît indépendant de la virulence de la souche.

Nous ne savons pas si l'on peut attribuer à chaque souche un pouvoir « allergisant » propre, c'est-à-dire si certaines souches produisent, à dose équivalente, une réactivité cutanée plus forte que certaines autres.

C. ETABLISSEMENT DE LA RÉACTIVITÉ CUTANÉE PAR DES INOCULATIONS RÉPÉTÉES. — L'effet produit diffère beaucoup suivant les doses inoculées et le rythme des inoculations :

a) *Inoculations rapprochées à doses croissantes*, la dernière inoculation étant égale à la dose de la même souche dont une injection unique induit la réactivité cutanée chez des lapins de même poids. Il semble que ces inoculations aient eu un effet *cumulatif*, car la réactivité cutanée a été plus précoce, plus intense et plus durable.

Chez deux lapins de 4 à 5 kg, la dose « allergisante » de D. 1/1 a été précédée de doses moindres. Le lapin n° 3 avait reçu D. 1/100 de S. I, trois jours avant la dose D. 1/1 de la même souche. Une

forte réactivité cutanée (+++) a été constatée le neuvième jour et elle s'est maintenue à +++) pendant 4 semaines, puis le lapin a été réinoculé. Le lapin n° 2 avait reçu D. 1/100 de S. III, onze jours avant et D. 1/10, six jours avant l'inoculation de D. 1/1 de la même souche. La réactivité cutanée était + le quinzième jour après la première inoculation et +++) le vingt et unième jour. Elle était encore à + au moment où il a reçu une nouvelle injection.

Chez un lapin de 1,8 kg (n° 10) la dose « allergisante » de D. 1/10 de S. I a été précédée, quatorze jours avant, de la dose D. 1/100. La réactivité cutanée était de ± le douzième jour, de ++ vingt-neuf jours après la première injection et de ++ encore le cent trentième jour, elle était enfin de + le cent quarantième jour et négative le deux centième jour, quand il a été réinoculé.

b) *Inoculations rapprochées à doses égales.* — Cette technique au contraire produit un *effet atténuant* : Elle donne une réactivité cutanée beaucoup plus faible que l'*injection unique* de la même dose.

Les n°s 31 et 32 (4 à 5 kg) ont reçu trois inoculations de D. 1/1 de S. I à trois jours d'intervalle. La réactivité cutanée a été très faible, généralement même douteuse, atteignant au maximum + et pendant une très courte période.

Le n° 29 de même poids a reçu trois inoculations égales, à sept jours d'intervalles, de D. 1/1 de S. II. Il eut une réactivité cutanée de ± le quinzième jour, douteuse le vingt-cinquième jour, nulle le quarantième jour.

c) *Inoculations éloignées à doses croissantes.* — Il s'agit de cas où une première inoculation insuffisante n'a pas induit la réactivité dans le délai habituel. On a pratiqué après ce délai une ou plusieurs réinoculations. Les effets sont les mêmes pour S. I et S. II malgré la différence de virulence. La dernière dose qui était égale à la dose « allergisante » de la même souche en inoculation unique pour les lapins de même poids a provoqué la réactivité cutanée de la même façon que si elle n'avait pas été précédée d'autres inoculations. Il n'y a donc ni *effet cumulatif*, ni *effet atténuant*. Cependant, la ou les premières injections ont modifié l'organisme puisque, comme nous l'avons vu, cette dernière dose a produit une réaction locale atténuée ou nulle.

Les lapins n°s 33 et 34 (2,9 kg), après une injection de D. 1/10, de S. I qui n'a pas induit la réactivité cutanée dans les délais habituels, ont été réinoculés, le vingt-cinquième jour, avec D. 1/5 et ont présenté une réponse cutanée positive vingt-cinq jours après la deuxième injection. Les lapins n°s 36 et 37, de même

poids, ont reçu la dose D. 1/10 de S. II, cette dose a été également incapable de produire la réactivité cutanée dans le délai habituel. Réinoculés le dix-huitième jour, avec D. 1/5, ils ont présenté une réactivité cutanée positive seize jours après la deuxième inoculation et une réactivité forte entre le vingt-deuxième jour et le quarante-deuxième jour. La réactivité commençait à décroître entre le trente-cinquième jour (lapin n° 34) et le cinquante-deuxième jour (n° 37) après la deuxième inoculation.

Le n° 28 (4 à 5 kg) a reçu chaque fois D. 1/1 de S. I, à dix-neuf jours d'intervalle. Au moment de la deuxième injection, la réactivité était \pm . Elle est devenue négative après la deuxième injection. Nous verrons dans le mémoire suivant les réactions de ces lapins à des inoculations ultérieures.

3^e Réactions générales aux primo-inoculations.

Dans certains cas, la primo-inoculation provoque des accidents généraux graves, soit immédiats et sans réaction locale, soit plus tardifs, après disparition précoce de la réactivité cutanée. Il s'agit généralement de lapins inoculés avec une dose trop forte eu égard à la virulence de la souche et à l'âge de l'animal. Dans des cas rares, certains lapins ont été tués par une dose normale sans qu'on sache la raison de cette sensibilité particulière.

Ces accidents généraux sont de deux types : soit immédiats sans réaction locale, soit secondaires, plus tardifs, précédés d'un abcès.

a) *Les accidents généraux immédiats* ont été observés dans les conditions suivantes :

Les inoculations à de jeunes lapins provoquent généralement une mort rapide (c'était le cas même pour S. I non virulente à des doses inférieures à celles que supporte le lapin adulte). Les deux jeunes lapins (n°s 8 et 9) de 1,5 à 2 kg, dont il a été question plus haut, ayant reçu l'un D. 1/1, l'autre D. 1/10 de S. I ont présenté du tremblement, de la dyspnée, de la diarrhée, un fort amaigrissement et ont succombé respectivement le troisième et le quatrième jour. Les réactions locales manquaient totalement chez l'un, étaient très discrètes chez l'autre.

Un seul lapin de 4 à 5 kg (le n° 16) est mort après inoculation de S. I (D. 1/10, deux jours de suite). Cette mort est probablement due à une cause intercurrente.

Par contre, comme nous l'avons vu, S. II, rendue très virulente par des passages sur la souris et inoculée en culture de cinq heures tue rapidement même le lapin adulte. La dose de D. 1/1 chez le n° 14 de 4 à 5 kg a produit une prostration immédiate et la mort en trente-six heures.

On n'a pas trouvé, dans ces cas mortels, de streptocoques aux autopsies, mais des congestions de tous les viscères.

b) *Les accidents généraux secondaires* surviennent après une phase de réaction locale et de réactivité cutanée très forte. Celle-ci disparaît brusquement et prématurément, tandis qu'éclatent les accidents. Ceux-ci peuvent guérir ou provoquer la mort. Ils sont moins brutaux que les accidents immédiats.

Chez le *lapin n° 38* inoculé avec D. 1/5 de S. I, la réactivité cutanée était apparue dix-huit jours après. Elle était + + + \pm le quarante-deuxième jour. Elle a baissé brusquement le soixante-dix-septième jour. Le lapin a maigri fortement, mais sans cachexie. La réactivité cutanée est restée douteuse jusqu'au cent quatre-vingtième jour, où elle est devenue positive (+), tandis que l'état général redevenait normal.

Le lapin n° 40 inoculé avec D. 1/5 de S. II avait une réactivité cutanée fortement positive (+ + +) le vingt-cinquième jour. Puis la réactivité cutanée a présenté une instabilité tout à fait inhabituelle. Elle était négative le trente-cinquième jour, + le quarante-quatrième jour, + + le cinquantième jour et négative définitivement le cinquante-neuvième jour. A partir de ce moment, le lapin a maigri rapidement, s'est cachectisé et il est mort le soixantequinzième jour.

II. — EXPÉRIENCES DE CONTRÔLE.

RÉACTIVITÉ CUTANÉE CROISÉE CHEZ LES LAPINS « ALLERGISÉS » OU NON A *Str. pyogenes*.

Des intradermoréactions ont été pratiquées chez des lapins ayant une réactivité cutanée positive ou négative aux filtrats de *Str. pyogenes* comparativement avec des filtrats d'espèces bactériennes différentes, appartenant les unes au genre *Streptococcus*, les autres à d'autres genres (*Staphylococcus pyogenes* souche 1975 et *E. coli* K 12).

Tous ces filtrats ont été préparés avec la même technique, injectés à la même dilution et de la même façon dans le derme des animaux.

1° Réactivité à des filtrats d'autres espèces de streptocoques.

Les réactions même douteuses sont très rares aussi bien chez les lapins ayant une réactivité cutanée positive à *Str. pyogenes* que chez les autres.

a) *Lapins à réactivité cutanée positive.* — Chez 19 lapins, dont 7 ont réagi fortement au filtrat de *Str. spyogenes*, 8 moyennement

et 4 faiblement dans 41 épreuves, on a pratiqué 35 épreuves avec un filtrat d'une souche du groupe C (tantôt C 33, tantôt C 50, tantôt C 8). Quatre lapins ont réagi faiblement ou de façon douceuse (deux avec +, deux avec \pm), chacun dans une seule épreuve, parmi plusieurs.

Chez 15 des précédents (ceux qui n'ont jamais réagi aux filtrats du groupe C) on a pratiqué 29 épreuves avec les filtrats de diverses espèces de streptocoques, à savoir, chez 8 lapins, avec des filtrats de streptocoques des groupes F et G et, chez 7 lapins, avec des filtrats de streptocoques des groupes B, D (une épreuve par lapin), F, G, H (deux épreuves par lapin). Quatre lapins à forte réactivité cutanée à *Str. pyogenes* ont réagi faiblement (+ ou \pm) avec des streptocoques des groupes F, D et *mitis*, un avec *Str. mitis* seul, deux avec le streptocoque du groupe G.

b) *Lapins dont la réactivité cutanée était devenue négative.* — Chez 8 lapins antérieurement « allergisés » et ne réagissant plus ou presque plus à l'épreuve intradermique et dont trois étaient cachectiques, on a pratiqué une épreuve avec les filtrats de toutes les espèces précédentes. Aucun n'a réagi.

c) *Lapins non « allergisés » après avoir été inoculés avec des filtrats de Str. pyogenes.* — Six lapins ayant reçu des inoculations sous-cutanées de S. I n'ont pas présenté de réaction cutanée avec les filtrats de S. I et de streptocoques des groupes C, F, et G.

d) *Lapins hyperimmunisés par vaccins intraveineux* (streptocoques de différents types du groupe A et d'autres groupes).

Sur 15 lapins, dont 6 avaient une réactivité cutanée faible (+) avec le filtrat de S. I, 3 avaient une réaction \pm et 6 aucune réaction. Les réactions cutanées aux filtrats des groupes C, F et G ont été négatives.

e) *Lapins neufs.* — Sur 8 lapins neufs réagissant aux filtrats de S. I, deux, qui donnaient avec S. I une réaction +, donnaient l'un +, l'autre \pm avec un filtrat du groupe C.

2^o Réactivité à des filtrats de cultures d'espèces bactériennes n'appartenant pas au genre Streptococcus (Staph. pyogenes et E. coli).

Un filtrat de Staph. pyogenes a produit chez 12 lapins ayant une réactivité cutanée positive à *Str. pyogenes*, une réaction d'intensité égale à celle des filtrats de streptocoques et aucune réaction chez 4 lapins neufs.

Un filtrat d'*E. coli* K12 injecté à ces mêmes lapins n'a produit aucune réaction.

DISCUSSION

Les réactions secondaires du lapin, consécutives à l'inoculation sous-cutanée sans adjuvants de streptocoques du groupe A, ont été étudiées comme se rapprochant des cas où une infection streptococcique de l'homme, qui reste essentiellement locale, déclenche des processus pathologiques secondaires non infectieux. Cette méthode de sensibilisation n'est pas usuelle dans la recherche de « l'allergie » streptococcique. Depuis les travaux de Derick et Swift [2], de Murphy et Swift [6], la méthode généralement employée était l'injection intradermique de très petites quantités de bactéries (cultures diluées de 1/10 à 1/1 000 000) répétées trois ou quatre fois par semaine pendant plusieurs mois.

Notre méthode nous a permis d'observer différents types de réactions primaires locales ou générales à l'inoculation et des modifications secondaires de l'organisme que révèlent une *réactivité cutanée de type retardé* et des réactions particulières aux réinoculations. (Ces dernières seront étudiées dans la publication suivante.)

I. — LES RÉACTIONS PRIMAIRES.

Elles varient suivant le nombre et la virulence des bactéries inoculées d'une part et la sensibilité du lapin (qui dépend surtout de son âge et de son poids) d'autre part.

Elles vont d'une réaction locale presque nulle, sans réaction générale, à une réaction générale suraiguë mortelle, sans réaction locale, en passant par des réactions locales plus ou moins intenses associées à des réactions générales atténuées ou nulles.

Deux réactions, bien que rares, sont intéressantes parce que rappelant les affections streptococciques humaines : le placard érysipélateux et l'éruption scarlatiniforme.

De l'intensité des réactions primaires et de l'effet des réinoculations précoces éventuelles dépendent en partie l'importance et l'évolution des réactions secondaires, et nous discuterons dans la publication suivante les relations entre les conditions et les caractères de la réaction primaire et ceux des réactions secondaires.

Cependant les modifications secondaires paraissent être constantes, même quand il n'y a pas de réaction primaire.

II. — LA RÉACTIVITÉ CUTANÉE.

Les conditions d'acquisition de la réactivité cutanée, le moment de son apparition, son intensité, son évolution, sa durée, sa négativation, dépendent également des quantités de streptocoques inoculés, du rythme et des doses des inoculations, de la virulence du germe, du poids et de l'âge du lapin.

a) *Réactivité cutanée provoquée par une seule inoculation.* — Il faut choisir une dose appropriée au poids du lapin et à la virulence de la souche. Dans ces conditions il se produit un abcès dont les caractères varient avec cette virulence et la réactivité cutanée évolue toujours de la même façon. Elle apparaît généralement vers le quinzième jour, atteint son maximum trente jours après l'inoculation et commence à décroître à partir du quarante-cinquième jour. Elle devient très faible ou disparaît entre le soixante-quinzième et le quatre-vingt-dixième jour. Toutefois, on a observé parfois la prolongation considérable du temps de la réactivité cutanée, en particulier chez un jeune lapin inoculé avec une souche très virulente.

b) *Réactivité cutanée provoquée par des inoculations répétées.*

a) *Les inoculations à des doses croissantes* dont les premières sont trop petites pour provoquer à elles seules la réactivité cutanée, semblent conférer celle-ci d'une façon plus intense et plus durable que l'inoculation unique.

β) *Après l'inoculation d'une première dose forte suivie d'une deuxième plus faible* au début de la période de réactivité cutanée, celle-ci atteint son maximum plus lentement, mais semble durer plus longtemps.

γ) *La réactivité cutanée n'est pas obtenue par l'inoculation de doses moyennes répétées à un rythme rapproché ou de doses fortes répétées,* même si les répétitions se font à un rythme espacé.

III. — LES RÉACTIONS GÉNÉRALES APRÈS UNE SEULE INOCULATION.

Elles sont de deux types : soit immédiates, soit secondaires.

Les réactions immédiates sont provoquées par des inoculations de doses trop fortes de souches virulentes, compte tenu de ce que chez les lapins jeunes de faible poids il suffit de doses relativement faibles de souches relativement peu virulentes pour les provoquer.

Les réactions générales secondaires surviennent généralement chez des lapins inoculés avec une souche virulente et seulement dans le cas de disparition précoce de la réactivité cutanée. Elles

paraissent dues à des produits toxiques libérés dans l'organisme par les bactéries.

Il paraît probable que l'existence de la réactivité cutanée correspond à la résistance relative et qu'après sa disparition une sensibilisation à ces produits se manifeste. Cette hypothèse sera discutée plus en détail, dans un prochain mémoire.

Nous verrons dans le mémoire suivant que des réactions générales tardives se produisent aussi après de multiples réinoculations et qu'elles ont probablement une cause analogue.

IV. — SPÉCIFICITÉ DE LA RÉACTIVITÉ CUTANÉE. DÉCELÉE PAR L'INTRADERMORÉACTION.

*La réactivité cutanée paraît avoir une spécificité d'espèce pour *Str. pyogenes*, c'est-à-dire pour le groupe A, et non une spécificité de type* (ce qui confirme les constatations de McEven et Swift [5]). En effet, elle était la même chez les lapins « allergisés » par les trois souches utilisées qui sont de types différents, S. I du type 12, S. II du type 24 et S. III du type 23 ; elle était la même aussi (avec quelques différences d'intensité) avec des filtrats de cultures de souches de différents types.

Au contraire, la réactivité cutanée était nulle ou (dans quelques cas rares) très faible avec les filtrats de cultures de 10 souches appartenant à 7 espèces de streptocoques (autres que les streptocoques du groupe A).

Deux objections peuvent être faites au sujet de la valeur de l'intradermoréaction comme test spécifique.

a) Les filtrats de certaines souches de *Str. pyogenes* ont donné des intradermorisactions positives chez tous les lapins « allergisés » ou non.

b) Les filtrats de *Staph. pyogenes* ont donné des intradermoréactions positives chez les lapins « allergisés » aux streptocoques.

a) *Les réactions à Str. pyogenes que nous avons obtenues chez les lapins non « allergisés » sont probablement dues à la toxine érythrogène.* — On sait qu'elle produit, en injection intradermique, une réaction de type retardé identique à la réaction allergique. Or, cette réaction était produite, en particulier, par les filtrats de la souche S II et de la souche A 264 (du type 25). La souche S. II paraît produire beaucoup plus de toxine érythrogène que la souche S. I, car son inoculation a été généralement suivie d'un érythème scarlatiniforme généralisé, ce qui n'a jamais été observé avec la souche S. I. La souche A 264 n'ayant pas été inoculée sous la peau, on ne sait pas si elle est capable de produire aussi un érythème scarlatiniforme.

Ando et coll. [4] et d'autres auteurs, auraient, dans des filtrats, séparé deux fractions, dont l'une contiendrait la toxine érythro-gène et l'autre une substance inconnue (qui pourrait être une substance déetectrice de la réactivité cutanée). Ils auraient obtenu chez l'homme des réponses soit à l'une, soit à l'autre des fractions suivant les individus. Nous avons entrepris des fractionnements de filtrats par diverses méthodes, pour essayer de purifier les substances « allergisantes ». Cependant, on peut éviter la confusion des réactivités cutanées « allergiques » avec les réactivités cutanées à la toxine. En effet, il faut admettre la nature « allergique » des réponses cutanées obtenues chez les lapins inoculés qui avaient des réactions cutanées négatives auparavant.

b) *Les réactivités cutanées très positives aux filtrats de Staph. pyogenes chez les lapins « allergisés » avec Str. pyogenes sont probablement dues à une parenté antigénique.* — Les lapins neufs éprouvés, qui avaient des réactivités cutanées négatives avec *Str. pyogenes*, les avaient aussi avec *Staph. pyogenes*; de même ceux qui avaient des réactions positives avec le streptocoque les avaient aussi avec le staphylocoque. Ceci pourrait être dû à un antigène commun aux deux espèces ou à un motif antigénique commun à deux antigènes appartenant respectivement à chacune.

Il s'agirait alors d'un fait analogue à celui qu'ont décrit Gell et Benaceraff [4], qui ont observé des réactions cutanées croisées, de type retardé entre deux antigènes protéiques différents couplés avec un même haptène. Notons aussi que Pakula [7] a décrit un antigène commun entre streptocoque et staphylocoque.

L'allergie tuberculeuse, bien que plus spécifique que l'allergie streptococcique, présente aussi des réactions croisées avec les bacilles paratuberculeux.

Les intradermoréactions positives chez les lapins neufs.

Certains lapins neufs ont des intradermoréactions positives à tous les filtrats de streptocoques du groupe A et en même temps au *Staph. pyogenes* utilisé.

Il n'est pas possible actuellement de savoir si cette réactivité anormale est acquise par une infection streptococcique antérieure ou si elle indique un terrain particulier.

V. — CONSÉQUENCES CONCERNANT L'EXPLORATION DE LA RÉACTIVITÉ CUTANÉE CHEZ L'HOMME.

De nombreux auteurs ont essayé d'explorer chez l'homme la réactivité cutanée avec des filtrats de cultures de streptocoque. Leurs résultats paraissent peu interprétables et nos expériences montrent qu'il ne peut en être autrement.

En effet, les filtrats contiennent divers produits toxiques (telle la substance érythrogène) en plus ou moins grande quantité, qui peuvent produire la réactivité cutanée chez des sujets non allergiques. De plus, la réactivité cutanée en elle-même n'est pas étroitement spécifique (réactions aux filtrats de staphylocoques chez le lapin) et enfin il doit exister chez l'homme comme chez le lapin des individus qui, pour des raisons inconnues, sont sensibilisés aux filtrats de streptocoques, et aussi des sujets sensibilisés à d'autres espèces bactériennes, pouvant donner des réactions croisées avec le streptocoque.

N. B. — Les diagrammes indiquant les inoculations et les réactions des animaux se trouveront dans le mémoire suivant.

RÉSUMÉ

L'inoculation sous-cutanée de streptocoques vivants peut provoquer des réactions locales, une réactivité cutanée aux injections intradermiques de filtrats de cultures et des réactions générales variant suivant le poids et l'âge du lapin, la virulence de la souche et la quantité de bactéries inoculées.

Ces réactions vont d'une réaction locale insignifiante sans réaction générale à des accidents généraux suraigus mortels en passant par des réactions plus ou moins fortes (abcès torpides ou aigus, placard érysipélateux). Une éruption scarlatiniforme peut aussi s'y associer.

La réactivité cutanée apparaît seulement si la primo-inoculation est faite à la dose suffisante (dose « allergisante ») eu égard au poids du lapin et à la virulence de la souche. Après inoculation unique, la réactivité cutanée apparaît vers le quinzième jour, augmente jusqu'au vingt-cinquième ou quarantième jour puis décroît soit pour disparaître entre le soixante-cinquième et le soixante-quinzième jour, soit pour persister très longtemps.

Les inoculations répétées et rapprochées à doses croissantes ont un effet cumulatif sur la réactivité cutanée ; à doses égales elles ont un effet atténué par rapport à celui de l'inoculation unique. La réactivité cutanée après des inoculations plus éloignées à doses croissantes apparaît dans les mêmes conditions qu'après une inoculation unique de la dernière dose.

Les réactions générales sont souvent mortelles. On les voit chez les lapins inoculés avec une dose trop forte eu égard à la virulence de la souche et à l'âge de l'animal. Elles sont immédiates ou secondaires. Celles-ci surviennent surtout dans le cas de disparition précoce de la réactivité cutanée.

La réactivité cutanée a une spécificité d'espèce et non de type. Les réactions croisées avec les filtrats des autres espèces de streptocoques sont exceptionnelles et insignifiantes. Par contre, les réactions croisées avec un filtrat de *Staph. pyogenes* étaient constantes.

Les filtrats de certaines souches de *Str. pyogenes* donnent chez tous les lapins une intradermoréaction positive, probablement due à la toxine érythrogène.

SUMMARY

MODIFICATIONS OF THE REACTIVITY OF RABBITS DETERMINED BY SUBCUTANEOUS INOCULATIONS OF *Streptococcus pyogenes* (GROUP A).

I. METHODS. EFFECTS OF PRIMARY INOCULATIONS.

Subcutaneous inoculations of living streptococci may initiate local effects, reactivity to intradermal injections of culture filtrates and general reactions varying according to the weight and age of the rabbits, the virulence of the strain and the quantity of bacteria inoculated.

These effects may be either purely local and unimportant or peracute and lethal. If of intermediate intensity (that is : torpid or acute abcesses or erysipelas), a scarlatin-like rash may occur.

The reactivity to intradermal injections of filtrate is observed only when the first inoculation is made with doses which can cause an allergic reaction. This varies according to the weight of the rabbit and the virulence of the strain. After a single inoculation, the reactivity to intradermal injections of filtrates becomes evident after the 15th day, increases up to the 25th or 40th, then decreases, either disappearing between the 65th and 75th, or continuing for a much longer period.

Repeated inoculations at short intervals with increasing doses have a cumulative effect on the dermal reactivity ; when given in equal doses, the effect is much less than that obtained with a single inoculation. After inoculations at greater intervals, with increasing doses, the dermal reactivity is observed in the same conditions as after one inoculation with the last dose.

The general reactions are often mortal. This is observed with rabbits inoculated with a dose, too strong as regard the virulence of the strain used, and also too strong for the age of the animal. They are immediate or secondary. The latter are observed above all in the case of the early disappearance of the dermal reactivity.

The dermal reactivity is specific for the species, and not for the type. Cross-reactions with the filtrates of other species of *Streptococci* are rare and unsignificant. On the other hand, cross-reactions with filtrates of *Staphylococcus pyogenes* were constant.

The filtrates of certain strains of *Streptococcus pyogenes* produced a positive intradermal reaction on all the rabbits used ; this is probably due to the erythrogenic toxin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDO (K.) and OZAKI. *J. Immunol.*, 1930, **18**, 223. — ANDO (K.), KURACHI (K.) and NISHIMURA (H.). *J. Immunol.*, 1930, **18**, 223.
- [2] DERICK (C. L.) and SWIFT (H. F.). *J. exp. Med.*, 1929, **49**, 615. — DERICK (C. L.) and ANDREWES (C. H.). *J. exp. Med.*, 1926, **44**, 55. — DERICK (C. L.), HITCHCOCK (C. H.) and SWIFT (H. F.). *J. exp. Med.*, 1930, **52**, 1.
- [3] DRACH (G.). *Thèse de Médecine*, Paris, 1960.
- [4] GELL (P. C. H.) et BENACERRAF (B.). *Symposium d'Immunopathologie*, Karger, édit., Bâle, 1958.
- [5] McEVEN (C.) and SWIFT (H. F.). *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 573.
- [6] MURPHY (G. E.) and SWIFT (H. F.). *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 627.
- [7] PAKULA (R.). *Acta microbiol. polon.*, 1955, **4**, 235.
- [8] REED (K. W.) and MATHESON (B. H.). *J. inf. Dis.*, 1954, **95**, 191.

**ÉTUDE DE LA TOLÉRANCE
DE LA SOURIS SURRENALECTOMISÉE
AU MOYEN D'UNE ENDOTOXINE
MARQUÉE AVEC DU ^{51}Cr**

par L. CHÉDID et M^{me} M. PARANT (*)
(avec la collaboration technique de M^{me} F. PARANT).

(Laboratoire d'Endocrinologie du Collège de France)

Les gluco-corticoïdes exercent une action anti-endotoxique très nette. C'est sans doute pour cette raison que la surrénalectomie et l'hypophysectomie rendent la souris environ cinq cents fois plus sensible aux endotoxines (Chedid [5, 6]).

On peut aussi augmenter la résistance de l'animal au poison bactérien par des injections préalables d'endotoxine à faible dose. Il ne s'agit pas dans ce cas d'immunisation mais d'un phénomène de « tolérance » non spécifique, puisqu'il est observable en utilisant des antigènes différents (Beeson [1], Thomas [12]), tolérance qui pourrait être transférée passivement par le sérum (Freedman [8]).

Nous avons montré jadis que cet effet ne résulte pas d'un hypercorticisme endogène puisqu'il peut être mis en évidence chez la souris surrénalectomisée à condition qu'elle ait reçu une très faible dose de cortisone (Chedid [7]).

Dans le présent travail, nous reprenons cette étude en utilisant une endotoxine marquée au moyen d'un radio-isotope (^{51}Cr).

TECHNIQUES.

Les souris provenant toutes de chez un même éleveur pèsent environ 25 g. Les injections intraveineuses sont faites dans la veine du pénis dans un volume égal ou inférieur à 0,25 ml. Les animaux anesthésiés à l'éther sont décapités et le sang recueilli sur héparine.

La surrénalectomie et l'ovariectomie sont réalisées par voie dorso-lombaire sous anesthésie à l'éther.

L'endotoxine (ASED) est extraite sous forme d'antigène glucido-lipidique par la méthode de Boivin à partir d'une souche de *Salmonella enteritidis* (variété Danysz). Elle est marquée au moyen de ^{51}Cr par la technique décrite par Braude et coll. [2]. Celle-ci consiste

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 13 avril 1961.

à mettre en contact 50 mg d'endotoxine avec 0,5 mC de ^{51}Cr (livré sous forme de CrO_4Na_2 dont l'activité spécifique est de 62,2 mC/mg), dans un volume de 10 ml à 37° pendant vingt-quatre heures. Après quoi l'antigène est précipité avec de l'alcool à 68°, séparé par centrifugation, et l'opération est répétée trois ou quatre fois jusqu'à ce que la radio-activité du surnageant soit devenue négligeable. Le culot est alors lavé à l'éther, desséché et pesé, puis remis en suspension dans de l'eau salée à 9 p. 1 000 à raison de 5 mg/ml. Pour assurer une bonne conservation, un antiseptique, le merseptyl, est ajouté à la concentration de 1/10 000. L'endotoxine ainsi obtenue a une activité d'environ 200 000 impulsions/min./mg.

La toxicité du produit est contrôlée en constatant que 1 µg tue 100 p. 100 des souris surrénalectomisées depuis quarante-huit heures. On s'assure que l'endotoxine est bien marquée en l'incubant avec du sang total. En effet, alors que le ^{51}Cr libre se fixe en majeure partie sur les hématies, 80 p. 100 de l'endotoxine radioactive reste dans le plasma (Braude [3]).

Pour l'étude des volumes sanguins, les hématies ont été marquées de la manière suivante :

Après centrifugation de 5 ml de sang hépariné, le plasma est remplacé par un volume égal d'eau salée à 9 p. 1 000 contenant 10 µG de ^{51}Cr . Une heure de contact *in vitro* et 3 lavages successifs sont suffisants.

Toutes les mesures de radioactivité ont été faites au compteur à scintillation.

RÉSULTATS.

1^o ETUDE DES VOLUMES SANGUINS. — Les volumes sanguins sont évalués en injectant 1 ml pour 100 g de poids corporel d'une suspension de globules rouges diluée au 1/10 et possédant une activité de 40 000 impulsions/minute.

Seize souris ont reçu 100 µg d'endotoxine (ASED) non marquée pour 100 g de poids corporel dix minutes après l'injection des erythrocytes. Un volume équivalent de sérum physiologique est injecté à 14 témoins.

Les animaux sont sacrifiés trente minutes après cette deuxième injection en les laissant saigner abondamment. Un échantillon de sang ainsi que différents organes sont alors prélevés et pesés.

Les sanguins de deux lots de souris pareillement traitées servent à évaluer l'hématocrite.

Dans nos expériences nous constatons que le volume sanguin des témoins est de 7,5 p. 100 et que la valeur de leur hématocrite est de 47 p. 100, alors que, chez les animaux qui ont reçu l'endotoxine, le volume sanguin est de 6,7 p. 100 et l'hématocrite de 52,8 p. 100 ($0,01 < p < 0,02$).

Par ailleurs, les volumes sanguins de certains organes sont rapportés dans le tableau I.

TABLEAU I.

	TÉMOINS (14)		ASED (16)	
	E S (*)	R S O (**) / R S T	E S	R S O / R S T
Foie	12,7	9,43	11,8	10,4
Rate	35,5	2,06	23	1,6
Poumons	34,5	3,02	32,5	3,44

(*) E S = Espace sanguin (sang résiduel de l'organe/poids de l'organe).
(**) $\frac{R S O}{R S T}$ = Radioactivité du sang de l'organe/Radioactivité du sang total.

Ces résultats montrent que trente minutes après l'injection d'endotoxine, il se produit une hémococoncentration qui explique la radio-activité plus élevée de l'échantillon de sang total mesuré. Il semble aussi que le volume sanguin de la rate soit diminué ($0,01 < p < 0,02$).

Ajoutons que ces effets disparaissent après une heure et ne se manifestent pas si l'on injecte des doses plus faibles d'endotoxine.

Le volume sanguin de la souris varie suivant les auteurs, qui ont utilisé d'ailleurs différentes méthodes de mesure (Kaliss [10], Carey [4], Ribble [11]).

Nous nous sommes basés sur les résultats ci-dessus dans les expériences qui suivent pour évaluer le sang total (7,5 p. 100 du poids corporel) et pour éliminer la radio-activité résultant du sang résiduel dans les organes.

2° COURBES D'ÉLIMINATION ET DISTRIBUTION DANS LE FOIE DE L'ENDOTOXINE MARQUÉE. — La souris surrenalectomisée succombant quelques heures après l'injection de 5 µg pour 100 g de poids corporel, les résultats qui suivent ont été obtenus chez l'animal intact aux doses de 100 à 200 µg/100 g de poids corporel. On constate que l'endotoxine s'élimine assez lentement du sang pour s'accumuler principalement dans le foie.

Ces courbes d'élimination sont en accord avec les résultats trouvés par différents auteurs (Carey [4], Ribble [11], Howard [9]). Il faut souligner cependant que ceux-ci utilisent en général des doses plus élevées d'antigène, lequel s'élimine d'autant plus vite qu'il est injecté à dose plus faible comme en témoignent, par exemple, les résultats suivants enregistrés chez des souris surrenalectomisées depuis six heures et qui sont sacrifiées trente

TABLEAU II.

	NOMBRE D'ANIMAUX	% DE LA RADIOACTIVITÉ INJECTÉE	
		sang total	foie
30 sec	4	76,8	—
2 mn	7	79,3	6,25
10 mn	8	70,9	15,1
30 mn	4	29,9	32,7
60 mn	4	21,45	33,4
24 h	8	2,4	25,4
48 h	6	0,6	24,5

minutes après l'injection d'endotoxine : radio-activité de sang total/radio-activité injectée :

- a) Chez 10 souris qui ont reçu 10 µg : 11 p. 100.
- b) Chez 10 souris qui ont reçu 100 µg : 31 p. 100.

Retenons du tableau II que, vingt-quatre heures après l'injection de 50 µg à une souris de 25 g, on retrouve une radio-activité correspondant à 1,25 µg dans le sang et à 12 µg dans le foie. Ces données sont utiles pour comprendre ce qui suit.

3° VARIATION DE LA DL₅₀ EN FONCTION DE L'INTERVALLE ÉCOULÉ ENTRE LA SURRENALECTOMIE ET L'INJECTION D'ENDOTOXINE. — La DL₅₀ chez la souris normale est de 250 µg et chez la souris surrenalectomisée depuis quarante-huit heures d'environ 0,5 µg si l'on utilise la voie intraperitoneale. Par voie intraveineuse l'endotoxine est légèrement plus toxique. Etant donné la stabilité de l'endotoxine dans le sang, nous avons cherché à raccourcir le temps écoulé entre l'intervention et l'administration du poison. Pour faire la part du traumatisme chirurgical, nous avons utilisé comme témoins des femelles castrées. A l'exception de celles-ci qui ont été injectées par voie intraperitoneale, en même temps que des témoins mâles ou femelles, tous les animaux qui figurent sur le tableau III sont des mâles injectés par voie intraveineuse.

On constate que l'ovariectomie n'augmente pas la sensibilité de l'animal à 50 µg. Par contre, il semble qu'il existe un rapport entre la dose injectée et le temps qui sépare l'administration d'endotoxine. Tout se passe comme si l'action protectrice des corticoïdes circulants disparaissait après quelques heures et qu'à ce moment la survie de l'animal dépendait du taux d'endotoxine dans le sang, décelable par la radio-activité. Nous avons constaté d'ailleurs, par des expériences préliminaires, qu'il existe un rapport entre la radio-activité et la toxicité du plasma.

TABLEAU III.

TRAITEMENT	MOMENT DE L'OPÉRATION								
	avant l'injection		o	après l'injection					
	6 h	1 h		1 h	3 h	6 h	16 h	24 h	
Sx (**) + 1 µg ASED	—	—	6/13(*)	—	—	—	—	—	
Sx + 2 µg ASED ...	0/13	—	1/17	0/5	3/5	5/5	—	—	
Sx + 10 µg ASED ...	0/16	—	1/10	1/5	0/5	5/5	—	—	
Sx + 50 µg ASED ...	—	—	—	—	0/5	2/5	—	24/24	
Sx + 50 µg ASED ip	0/5	0/10	0/5	0/10	0/10	10/35	3/5	5/5	
Cx + 50 µg ASED ip	5/5	10/10	5/5	5/5	—	6/6	—	—	

(*) Nombre de survivants/nombre d'animaux du lot.
(**) Sx = surrénalectomisés. Cx = castrés.

Cependant, comment expliquer que, si l'on surrénalectomise la souris vingt-quatre heures après 50 µg d'endotoxine, elle survive bien qu'elle conserve une radio-activité équivalente dans le sang à 1,25 µg et dans le foie à 12 µg ?

Les expériences qui suivent, montrent que la résistance d'animaux ainsi traités a augmenté.

4° AUGMENTATION DE LA TOLÉRANCE CHEZ LA SOURIS SURRÉNALECTOMISÉE. — Sur le tableau IV figurent les résultats de plusieurs expériences.

Les témoins ont reçu, quatre heures après la surrénalectomie, 2 ou 10 µg d'endotoxine.

TABLEAU IV.

TRAITEMENT	SURVIE EN 48 h	
TÉMOINS SURRÉNALECTOMISÉS	{ 2 µg ASED i.v. 10 µg ASED i.v.	1/25 2/28
« TOLÉRANTS » SURRÉNALECTOMISÉS	{ Témoins survie 2 µg ASED i.v. 10 µg ASED i.v. 20 µg ASED i.v.	23/23 23/25 27/32 6/9

Toutes les autres souris ont reçu 50 µg d'endotoxine, vingt-quatre heures avant la surrénalectomie. Certaines de celles-ci sont opérées seulement et serviront de témoins de survie. Les autres recevront une nouvelle injection d'endotoxine.

Ce tableau montre que les souris qui ont reçu 50 µg la veille ont une résistance augmentée d'au moins dix fois, puisqu'une nouvelle injection de 20 µg n'est pas 100 p. 100 mortelle. Cet accroissement de la résistance suffirait à expliquer la survie, même si la radio-activité décelée dans le sang et dans le foie correspondait à des doses toxiques d'antigène.

Par ailleurs, cette exaltation de la tolérance s'accompagne d'une élimination plus rapide du sang et d'une augmentation de la fixation hépatique de l'endotoxine.

Certains des animaux (« tolérants ») qui figurent sur le tableau suivant ont reçu 50 µg d'endotoxine non marquée vingt-quatre heures avant d'être surrénalectomisés. Quatre heures après l'opération, on leur injecte en même temps qu'à des témoins, 10 µg d'endotoxine radio-active (tableau V).

TABLEAU V.

		NOMBRE D'ANI- MAUX	% DE LA RADIOACTIVITÉ INJECTÉE		
			sang total	foie	rate
1 mn	{ témoins	10	74,5	10,25	0
	{ tolérants	10	48,8	22	0,75
3 mn	{ témoins	6	56,5	21,4	0,6
	{ tolérants	4	17,8	44,9	4
5 mn	{ témoins	9	39,7	31,5	2,3
	{ tolérants	10	14,06	49,2	4,08
10 mn	{ témoins	5	13	54	3,3
	{ tolérants	6	14,6	46,6	3,64
15 mn	{ témoins	7	12,5	53,8	3,45
	{ tolérants	7	16,7	43,4	2,56

Ce tableau permet de constater que l'endotoxine marquée est éliminée beaucoup plus rapidement chez les souris qui ont reçu l'injection préalable de 50 µg. Cependant, les taux de radio-activité du sang et des organes ont tendance à devenir semblables en quinze minutes.

Cette résistance accrue de la souris est-elle en rapport avec une fixation hépatique plus grande ? Pour nous en assurer, nous avons recherché si l'injection par voie intrasplénique diminuait la toxicité de l'endotoxine. On sait, en effet, que les substances qui subissent une détoxicification hépatique notable (telles certaines hormones), perdent leur activité lorsqu'elles sont injectées dans la circulation porte. Ces essais furent réalisés chez des souris surrénalectomisées depuis quarante-huit heures.

Celles-ci, réparties en 6 lots de 8, ont reçu 1, 2 ou 5 µg soit par voie intravincéuse, soit par voie intrasplénique. Toutes ont succombé dans les mêmes délais avec la plus faible dose.

De plus, les courbes d'élimination de l'endotoxine sont similaires, quelle que soit la voie d'injection.

RÉSUMÉ.

Il n'est pas nécessaire de surrénalectomiser la souris vingt-quatre ou quarante-huit heures au préalable pour augmenter sa sensibilité aux endotoxines. L'ablation de la glande peut se faire en même temps ou même quelques heures après l'injection du poison. L'on retrouve d'ailleurs dans le sang, même après plusieurs heures, une radio-activité correspondant à une quantité d'endotoxine suffisante pour tuer l'animal privé de ses surrénales.

Alors qu'habituellement il faut injecter plusieurs fois l'antigène pour rendre l'animal deux fois plus résistant, dans nos expériences la « tolérance » aux endotoxines s'établit plus rapidement. En effet, vingt-quatre heures après l'injection de 50 µg, la souris résiste à plus de dix fois la dose qui est mortelle pour les témoins surrénalectomisés. Cette augmentation de la tolérance s'accompagne d'une élimination du sang et d'une fixation hépatique accélérées de l'endotoxine marquée au ^{51}Cr .

Cependant injectée par voie intrasplénique (c'est-à-dire mise au contact direct du foie) l'endotoxine conserve toute sa toxicité.

SUMMARY

STUDIES ON TOLERANCE IN ADRENALECTOMIZED MICE BY MEANS OF AN ENDOTOXIN LABELLED WITH ^{51}Cr .

It is not necessary to carry out the adrenalectomy 24 or 48 hours before the injection to increase the sensitivity of mice to endotoxins. The removal of the gland can be performed at the same time, or even a few hours after, the endotoxin injection. Several hours later, the blood still possesses a radioactivity corresponding to an amount of endotoxin sufficient to kill mice deprived of their adrenals.

Usually the antigen must be injected several times, to render mice twice more resistant. In the authors experiments, the tolerance to endotoxins appears more rapidly. Twenty four hours after the injection of 50 µg, mice resist to a dose tenfold higher than the dose which is lethal for adrenalectomized controls. This increase of tolerance is accompanied by an increased elimination of toxin from the blood and an increased fixation in the liver.

However, if the endotoxin is injected by the intrasplenic route (i. e. in direct contact with the liver), it preserves its toxicity.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BEESON (P. B.). *J. exp. Med.*, 1947, **86**, 29.
- [2] BRAUDE (A. I.), CAREY (F. J.), SUTHERLAND (D.) and ZALESKY (M.). *J. clin. Invest.*, 1955, **34**, 850.
- [3] BRAUDE (A. I.), CAREY (F. J.) and ZALESKY (M.). *J. clin. Invest.*, 1955, **34**, 858.
- [4] CAREY (F. J.), BRAUDE (A. I.) and ZALESKY (M.). *J. clin. Invest.*, 1958, **37**, 441.
- [5] CHÉDID (L.), BOYER (F.) et SAVIARD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 213.
- [6] CHÉDID (L.). *Hormones et Infection*, Suppl. XLII, *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, 1957.
- [7] CHÉDID (L.) et BOYER (F.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1741.
- [8] FREEDMAN (H. H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1959, **102**, 504.
- [9] HOWARD (J. G.), BIZZI (G.), HALPERN (B. N.), STIFFEL (C.) and MOUTON (D.). *Brit. J. exp. Path.*, 1959, **40**, 281.
- [10] KALISS (N.) and PRESSMAN (D.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1950, **75**, 16.
- [11] RIBBLE (J. C.), ZALESKY (M.) and BRAUDE (A. I.). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1959, **105**, 272.
- [12] THOMAS (L.). *Amer. Rev. Physiol.*, 1954, **16**, 467.

ÉTUDE DE L'ACTION INHIBITRICE SPÉCIFIQUE DES ANTISÉRUMS SUR LES CULTURES L DES BACTÉRIES

**I. — EXCLUSION DU RÔLE DES ANTICORPS O ET H
DANS LE PHÉNOMÈNE D'INHIBITION SPÉCIFIQUE DES CULTURES L.**

par R. MINCK, A. KIRN et M^{me} FLECK (*).

*(Institut d'Hygiène et de Bactériologie
de la Faculté de Médecine de Strasbourg)*

Edward et Fitzgerald [1] ont montré l'action inhibitrice spécifique des immunsérum décomplémentés sur les cultures de PPLO ; cette recherche peut d'ailleurs servir au typage sérologique de ces organismes. Mais leurs résultats furent inconstants lorsqu'ils tentèrent de reproduire le même phénomène avec des formes L des bactéries.

Von Prittwitz-Gaffron [5], utilisant des antisérum bactériens O et H, n'observa aucune inhibition des cultures L.

Dans une publication antérieure (Minck et Kirn [3]), nous avons montré que seules les formes L du type 3 A, suivant la nomenclature de Dienes, sont sensibles à l'effet de l'immunsérum spécifique et que l'anticorps H n'est pas en cause. Les cultures du type 3 B ne sont nullement inhibées.

Il est vraisemblable que cette différence de comportement est liée à une structure différente de la paroi limitante de ces organismes : l'aspect morphologique, le pouvoir d'adsorber certains phages, l'aptitude à la réversion, témoignent de la persistance, chez la forme L du type 3 B, d'une partie au moins de la paroi de la bactérie initiale (Tulasne et coll. [4]).

Dans le présent travail, nous rapportons le résultat de l'étude comparée du pouvoir inhibant de différents sérum anti-bactériens et anti-L.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 13 avril 1961.

TECHNIQUES

1^o Souches utilisées pour l'immunisation des lapins.

E. coli 276, variante S et R.

Proteus P 18 et sa forme L (type A).

a) *Antigènes bactériens*. — Culture formolée.

Extrait trichloracétique préparé selon la technique de Boivin et purifié par de multiples précipitations par l'alcool.

Extraits bactériens obtenus par éclatement de la paroi par congélation dans le mélange acétone-glace carbonique en présence ou en l'absence de lysozyme, selon la technique de Kohn [2]. Après décongélation, la suspension est portée deux heures à 37°, puis centrifugée une heure à 30 000 g. Le surnageant d'une part, et le culot soigneusement lavé d'autre part, additionnés de formol, sont utilisés pour l'immunisation.

b) *Antigène L*. — Nous utilisons une souche L de P 18 adaptée à pousser en voile sur milieu liquide entièrement synthétique de Medill, sans addition de sérum. Les cultures de 5 à 8 jours sont congelées et décongelées à trois reprises, formolées, dialysées puis concentrées par lyophilisation.

2^o Préparation des immunsérum.

Les immunsérum sont obtenus sur lapin. Une prise de sang effectuée avant la première injection nous donne le sérum témoin. La première injection est pratiquée par voie intrapéritonéale, les suivantes, espacées de quatre jours, par voie intraveineuse. Tous les sérum sont chauffés à 56° pendant une heure.

3^o Etude des sérum obtenus.

a) Recherche de l'agglutination O de *Proteus* P 18 et d'*E. coli* 276, avec une suspension alcoolique de germes.

b) Recherche du pouvoir inhibiteur sur la culture L. On coule, dans un moule cylindrique en plastique de 14 mm de diamètre, 0,2 ml de gélose à 1,6 p. 100, préalablement refroidie à 45°, mélangée à 0,2 ml du sérum à étudier. Après refroidissement, la pastille est décollée et déposée au centre d'une boîte de Petri de 7 cm de diamètre, dans laquelle on coule ensuite du milieu de Medill gélosé à 0,8 p. 100, additionné de 20 p. 100 de sérum de cheval et de pénicilline. On laisse reposer les boîtes vingt-quatre heures à la température ambiante et vingt-quatre heures à + 4°. On coule enfin à la surface du milieu 5 ml de milieu de culture gélosé, refroidi à 45°, additionné de 0,1 ml d'une suspension standard de culture L. On scelle à la paraffine. La

lecture est faite après quarante-huit heures d'étuve à 37°. La sensibilité de cette technique est limitée par la taille de la pastille.

c) Etude des différents sérums par la technique de diffusion en gélose et par immuno-électrophorèse en gélose, avec les antigènes suivants :

- a) Antigènes servant à l'immunisation des lapins ;
- β) Autolysats chloroformiques (sept jours à 37°) ;
- γ) Extraits de culture L par agitation au mixer en solution physiologique ;
- δ) Extraits bactériens (surnageant) obtenus après congélation dans le mélange acétone-glace carbonique.

RÉSULTATS.

1^o *E. coli* 276.

Ce germe, aussi bien sous sa forme smooth que rough, donne sans difficulté, naissance, sur milieu synthétique de Medill additionné de 20 p. 100 de sérum de cheval, à des formes L du type A.

Ces formes L sont « fixées » d'emblée, dès la première culture. Nous n'avons jamais pu obtenir de forme L du type 3 B avec cette souche.

Nous avons immunisé des lapins avec la variante S et d'autres lapins avec la variante R. Le sérum des lapins immunisés avec la variante R n'agglutine pas la souche S correspondante.

Cependant, nous n'avons observé aucune différence quant au pouvoir inhibiteur des deux sérums sur les formes L correspondant aussi bien au type R que S. Cette première expérience montre que l'action inhibitrice des sérums n'est pas liée à la présence d'anticorps correspondant aux antigènes de surface et plus précisément à la présence de l'anticorps O absent chez la variante R.

2^o *Proteus* P 18.

Pour confirmer nos premiers résultats, nous avons repris cette étude avec le *Proteus* P 18 et sa forme L fixée, obtenue et étudiée dans notre laboratoire depuis plus de dix années. Ce choix a été dicté par l'adaptation de la culture L à un milieu liquide, entièrement synthétique. Nous avons, en effet, constaté que le pouvoir antigénique de cette culture est de beaucoup supérieur à celui des cultures additionnées de sérum de cheval.

Mais l'analyse des sérums anti-bactériens et anti-L, aussi bien par la technique de diffusion en gélose que par l'immuno-électrophorèse, montra que ces deux sérums, mise à part la présence

de l'anticorps O, n'étaient pas comparables. Les sérum anti-L donnent, en présence de l'antigène L, plusieurs lignes de précipitation, qu'on ne retrouve pas avec les sérum anti-bactériens. Nous

TABLEAU I.

LAPINS N°s	ANTIGÈNES UTILISÉS POUR L'IMMUNISATION	TITRE DES ANTICORPS : AGGLUTININES O	POUVOIR INHIBITEUR DU SÉRUM (*)
34	Germes formolés	1/2500	0
39-40 (pool 3)	Germes traités par l'alcool	1/1280	1/8
37	Extrait trichloracétique de germes (antigène O)	1/25000	0
28	Surnageant de centrifugation de l'extrait de germes congelés en présence de lysozyme	1/1280	1/4
45-47 (pool 1)	Idem	1/2500	1/8
27	Culot de centrifugation de l'extrait de germes congelés en présence de lysozyme	1/10000	1/4
26	Formes L, formolées	1/1280	1/16 (**)
29-30 (pool 2)	Formes L, formolées	1/640	1/250
42	Idem	1/1280	1/250
44	Idem	1/2500	1/250
46	Formes L chauffées 2 h 30 à 100°	1/320	0

(*) Déterminé en prenant la plus forte dilution de sérum donnant une zone d'inhibition nette, c'est-à-dire de la taille de la pastille (voir Techniques).

(**) Il s'agit d'un lapin auquel on a injecté une culture L, non traitée au préalable par congélation comme les suivantes.

en avons conclu que, par suite de l'absence d'une paroi rigide, l'injection de forme L révèle l'existence de fractions antigéniques intracellulaires qui, dans la bactérie normale, sont masquées par la paroi. Effectivement, les sérum préparés avec des extraits bactériens, selon la technique de Kohn [2], qui provoque, ainsi que l'étude de coupes ultra-fines au microscope électronique nous l'a prouvé, la rupture de la paroi bactérienne et la libération d'antigènes intracellulaires sont, eux, comparables aux sérum anti-L.

Nous nous proposons, dans une publication ultérieure, d'exposer en détail les résultats de l'étude antigénique comparée de la forme bactérienne et de la forme L correspondante.

Dans le tableau I figurent le titre en anticorps O et le pouvoir inhibiteur des différents sérum étudiés.

L'examen de ce tableau permet de constater que, d'une façon générale, tous les sérum ont des titres d'agglutinines O valables. L'antigène O, antigène de surface, est donc conservé dans la forme L ; cette observation confirme les résultats antérieurs. Quoique nous ne possédions pour l'instant aucune donnée quantitative, nous avons cependant l'impression que, à poids égal, la forme L possède beaucoup moins d'antigène O que la forme bactérienne.

Ce tableau montre d'autre part, très nettement, qu'il n'existe aucun rapport entre la teneur en anticorps O et le pouvoir inhibiteur du sérum. Ceci est particulièrement net dans le cas du sérum 37, obtenu par injection d'antigène O purifié.

La preuve que l'anticorps O n'est pas responsable du pouvoir inhibiteur des sérum nous est fournie par les expériences de saturation des différents sérum avec l'extrait trichloracétique de germes : les résultats sont consignés dans le tableau II.

Ce tableau montre que la saturation de l'anticorps O ne diminue pas le pouvoir inhibiteur du sérum.

Nous avons, d'autre part, constaté que la saturation du sérum 42 avec des cultures jeunes, lavées, de bacilles P 18 donne un résultat identique : disparition des agglutinines O sans modification du pouvoir inhibiteur sur la culture L. L'étude immuno-électrophorétique de ce sérum ainsi saturé nous a montré la persistance des lignes de précipitation correspondant aux antigènes « internes ».

Par contre, ce pouvoir inhibiteur disparaît après saturation de ce sérum avec des cultures de formes L.

Il est donc vraisemblable qu'un anticorps correspondant à un antigène intracellulaire est responsable de l'action inhibitrice spécifique des immunosérum. Cette hypothèse semble étayée par l'activité supérieure des sérum anti-L ; mais nous ne pouvons pas,

pour l'instant, expliquer le faible pouvoir inhibiteur des sérum obtenus par injection d'extraits bactériens traités par la congélation, qui, à l'analyse par l'immuno-électrophorèse, sont comparables aux sérum anti-L.

TABLEAU II.

LAPINS N°s	ANTIGÈNES UTILISÉS POUR L'IMMUNISATION	AVANT SATURATION		APRÈS SATURATION AVEC ANTIGÈNE O	
		Agglutinines O	Pouvoir inhibiteur	Agglutinines O	Pouvoir inhibiteur
39-40 (pool 2)	Germes traités par l'alcool	1/1280	1/8	1/40 ±	1/8
45-47 (pool 1)	Surnageant de centrifugation de l'extrait de germes congelés traité par le lysozyme	1/2500	1/8	1/40 ±	1/8
29-30 (pool 3)	Formes L, formolées	1/640	1/250	0	1/250
26	Formes L, formolées	1/1280	1/16	0	1/16
		AVANT SATURATION		APRÈS SATURATION AVEC ANTIGÈNE L	
		Agglutinines O	Pouvoir inhibiteur	Agglutinines O	Pouvoir inhibiteur
42	Formes L, formolées	1/1280	1/250	0	0

RÉSUMÉ.

Les auteurs constatent la présence dans le sérum anti-L d'anticorps correspondant à des antigènes « internes » comparables à ceux trouvés dans les sérum obtenus après inoculation de bactéries dont la paroi a été rompue. De même que l'anticorps H, l'anticorps O n'est pas responsable de l'inhibition spécifique de la culture L par l'antisérum.

SUMMARY

STUDY OF THE SPECIFIC INHIBITORY ACTION OF IMMUNE SERA ON BACTERIAL L CULTURES.

The authors demonstrate in anti-L sera the presence of antibodies to « internal » antigens, similar to those found in immune sera obtained after injection of bacteria the cell-wall of which has been disrupted.

Neither antibody anti-H nor antibody anti-O is responsible for the specific inhibition of L cultures by immune sera.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EDWARD (D. G.) and FITZGERALD (W. A.). *J. gen. Microb.*, 1951, **5**, 576.
- [2] KOHN (A.). *J. Bact.*, 1960, **79**, 697.
- [3] MINCK (R.) and KIRN (A.). *Ann. New York Acad. Sci.*, 1960, **79**, 658.
- [4] TULASNE (R.), MINCK (R.), KIRN (A.) et KREMBEL (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 859-874.
- [5] VON PRITTWITZ-GAFFRON (J.). *Zbl. Bakt. I, Orig.*, 1955, **100**, 313.

POUVOIR ÉLASTOLYTIQUE DES FILTRATS DE CULTURE D'UN GERME APPARTENANT AU GROUPE SUBTILIS MESENTERICUS (*)

par Philippe COMTE (**), Suzanne BAZIN (***)
et Albert DELAUNAY (****)

(avec la collaboration technique de Waltraut WOHLFARTH).

(Institut Pasteur, Garches [S.-et-O.])

Des filtrats de culture d'un germe appartenant au groupe *subtilis-mesentericus*, précipités par l'acétone, conduisent à l'obtention d'une poudre blanc jaunâtre, douée de propriétés protéolytiques. Cette poudre, préparée sous le nom de Protéase B, est utilisée en ménagerie lors de l'opération dite du « confitage ». Nous avons voulu savoir si cette Protéase B était douée d'un pouvoir élastolytique. Nos résultats sont reproduits ici.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

Les échantillons de Protéase B que nous avait aimablement procurés la Société Rapidase, nous les avons mis en solution soit dans de l'eau distillée, soit dans différents tampons. Les préparations étaient agitées pendant trente minutes puis centrifugées, la centrifugation permettant d'éliminer les résidus insolubles.

Les solutions ainsi obtenues ont été mises en incubation à 37°, sous agitation régulière dans un appareil de Warburg, pendant des temps variables, en présence de quantités plus ou moins fortes d'élastine. La protéine avait, au préalable, été extraite du ligament de la nuque du bœuf selon la technique de Partridge et

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 13 avril 1961.

(**) Ingénieur chimiste.

(***) Chargée de Recherches au C. N. R. S., Institut Pasteur, Garches (Seine-et-Oise).

(****) Chef du Service de Pathologie expérimentale, Institut Pasteur, Garches (Seine-et-Oise).

coll. [6]. Cette élastine apparaît, à l'examen microscopique, sous l'aspect de filaments fins et isolés (il n'y a pas d'amas). Sa teneur en hexosamines ne dépasse pas 0,2 p. 100. Elle est totalement insoluble dans l'eau distillée et dans les tampons que nous avons utilisés.

L'action élastolytique dont nous allons parler se traduit macroscopiquement par la dissolution de l'élastine. Celle-ci fut mesurée quantitativement, d'après l'absorption de la solution centrifugée aux ultraviolets à 280 m μ (cette absorption est due à la présence de tyrosine dont l'élastine contient environ 1,5 p. 100).

RESULTATS

Nos principaux résultats sont reportés dans les trois tableaux ci-joints.

TABLEAU I. — Influence du temps d'incubation sur la quantité d'élastine détruite par la Protéase B dans l'eau distillée

(Au départ : 50 mg d'élastine et, en solution, 5 mg de Protéase B).

TEMPS D'INCUBATION	QUANTITÉ D'ÉLASTINE SOLUBILISÉE (en mg)
30 minutes	2,5
1 heure	4,6
2 heures	9,1
3 heures	13,2
4 heures	15,1
6 heures	20,2
12 heures	24,3
24 heures	25,6

De l'examen de ces trois tableaux, il ressort que la Protéase B est parfaitement capable de dissoudre l'élastine. Toutefois, la quantité dissoute apparaît variable en fonction du temps d'incubation que l'on a choisi, de la nature du milieu où se déroule l'opération, de la présence ou non d'un inhibiteur dans le milieu, etc. Nous insisterons sur les points suivants :

1° L'activité de l'enzyme reste pratiquement constante pendant trois heures (la quantité de substrat dégradé apparaît en effet proportionnelle au temps d'action de l'enzyme). Puis elle se ralentit,

le ralentissement étant dû, selon toute vraisemblance, à une action inhibitrice exercée par les produits de dégradation.

2° L'enzyme est active dans des limites de pH comprises entre 5,5 et 10,5. L'optimum paraît se situer autour de 9,8.

3° Pour un rapport pondéral enzyme-substrat égal à 0,1 (dix fois plus d'élastine que d'enzyme), la quantité d'élastine dissoute en une heure, à 37°, à un pH optimum et en l'absence d'inhibiteurs, est de 4,6 mg.

4° L'activité de l'enzyme est diminuée nettement par les sels neutres (phosphate, chlorure) utilisés à des concentrations supérieures de 0,15 M. Elle est légèrement diminuée par la diéthylmalonylurée (véronal). Elle n'est pas troublée par la glycine.

TABLEAU II. — Influence du taux d'enzyme mis en expérience sur la solubilisation de l'élastine

(Au départ, dans les flacons : 10 mg d'élastine ; examen fait après incubation de la préparation d'une durée de deux heures à 37°).

TAUX DE PROTÉASE B (en mg)	QUANTITÉ D'ÉLASTINE SOLUBILISÉE (en mg)
1	9,5
0,50	7,2
0,25	6,2
0,10	3,8
0,050	2
0,025	0,5
0,010	traces

La cystéine et aussi les ions métalliques Zn et Hg l'inhibent complètement. Les ions Ca l'inhibent partiellement. Les ions Mg demeurent sans influence.

Le sérum normal de cobaye est capable, de son côté, d'arrêter totalement l'action de l'enzyme.

A côté de celles dont les résultats sont exposés dans nos trois tableaux, d'autres expériences ont été effectuées dont le but était de mettre éventuellement en évidence une action protéolytique de l'enzyme sur divers substrats : sérumalbumine bovine, fibrinogène, caséine, collagène. Ces différents substrats étaient mis en présence de l'enzyme (en présence d'un tampon glycine de pH 9,8) dans un rapport pondéral enzyme-substrat égal à 0,1. Après une heure d'incubation à 37°, les protéines non hydrolysées étaient précipitées par l'acide trichloracétique. Les produits

TABLEAU III. — Influence exercée par la nature du milieu (et son pH) sur la solution de l'élastine par la Protéase B

(Au départ, étaient présents dans le milieu 10 mg d'élastine et 1 mg de Protéase B ; examen après une heure d'incubation à 37°).

NATURE DU MILIEU	pH DU MILIEU	QUANTITÉ D'ÉLASTINE SOLUBILISÉE
Tampon Mc Ilvaine	4,5	0
Tampon Mc Ilvaine	5	0,05
Tampon Mc Ilvaine	5,5	1,2
Tampon Mc Ilvaine	6	1,2
Tampon Mc Ilvaine	7	1,5
Tampon Mc Ilvaine	8	1,8
Tampon bicarbonate	9,2	3,2
Tampon bicarbonate	9,8	2,9
Tampon bicarbonate	10,7	0
Tampon glycine	8,6	4
Tampon glycine	9,2	4,1
Tampon glycine	9,4	4,2
Tampon glycine	9,8	4,6
Tampon glycine	10	1,3
Tampon glycine	10,4	0,75
Tampon véronal	9,2	2,5
Tampon véronal	8,6	2,5
Tampon phosphate M/15	9,2	1,7
Tampon phosphate M/30	9,2	2
Tampon phosphate M/60	9,2	4,4
Tampon phosphate M/100	9,2	4,6
Solution ClNa 0,17 m	7	3
Solution ClNa 0,017 m	7	4,3
Eau distillée	6,5	3,7
Tampon glycine : (avec Cl ₂ Ca 0,05 M)	9,8	0,75
(avec SO ₄ Mg 0,05 M)	9,8	4,55
(avec SO ₄ Zn 0,05 M)	9,8	0
(avec Cl ₂ Hg 0,05 M)	9,8	0
(avec cystéine 0,01 M)	9,8	0
(avec sérum de cobaye au 1/5)	9,8	0

dissous étaient dosés par la mesure de leur absorption dans l'U. V. à 280 m μ .

Les résultats obtenus ont été les suivants. En une heure, la Protéase B a hydrolysé 1,60 mg de sérumalbumine bovine, 3,40 mg de fibrinogène, 4,3 mg de caséine.

Eu égard au collagène, le substrat utilisé était du collagène acidosoluble préparé à partir du tendon de la queue du rat et précipité par du chlorure de Na. Le temps d'incubation terminé, nous avons recherché quelle était la teneur du liquide surnageant en hydroxyproline. Mais nous n'avons pu déceler aucune trace de ce corps (même dans un milieu soumis à une incubation exceptionnellement longue [douze heures]). Il apparaît par là que la Protéase B n'est pas en mesure d'attaquer le collagène.

DISCUSSION

L'existence d'élastases était suggérée déjà par des observations anciennes : intérêt des extraits pancréatiques utilisés empiriquement pour le « confitage » des peaux de mégisserie ; pouvoir élastolytique que possèdent les filtrats de culture de *Ps. pyocyanea* et qu'avait noté C. Eigkman en 1904. Dès 1878, Waelchli [9] aurait observé l'attaque de l'élastine du ligament de la nuque par un extrait de pancréas bovin. Pourtant, pendant des lustres, ces enzymes n'ont pas sérieusement retenu l'attention. Pour qu'elles deviennent un sujet d'étude d'actualité, il a fallu la découverte d'une élastase pancréatique, annoncée par Balo et Banga [1], en 1949.

L'élastase, dont nous avons étudié dans ce travail les propriétés les plus caractéristiques, fait penser par certains traits à celle isolée par J. Balo et I. Banga [2]. Le pH optimum d'action est sensiblement le même. On relève l'existence d'inhibiteurs identiques : sérum, sels neutres. Toutefois, l'élastase bactérienne utilisée par nous paraît, comparativement, moins active ; ainsi, dans le même temps d'action, en l'absence d'effecteur, son activité est trois fois moindre. En outre, elle est inactivée par la cystéine qui, au contraire, active l'élastase pancréatique.

Très récemment, des élastases ont été isolées, aux Etats-Unis, à partir de quelques microorganismes, par exemple de certains *Actinomyces* par Sbarra et coll. [7], d'un *Flavobacterium* par Mandl et coll. [4, 5]. A en juger d'après leurs caractères respectifs, l'élastase contenue dans la Protéase B et qui est élaborée par un germe qui, lui, entre dans le groupe *subtilis-mesentericus*, serait à rapprocher des premières (*Actinomyces*) ; elle serait en revanche différente de la seconde (*Flavobacterium*). Quoi qu'il en soit, l'existence d'élastases d'origine bactérienne mérite, d'ores et déjà, d'être considérée comme un fait acquis. Un fait nouveau aussi. Les collagénases, les hyaluronidases, les héparinases de provenance bactérienne auront attendu moins longtemps leur identification.

Une question, toutefois, reste posée : faut-il croire à l'existence d'élastases spécifiques ou faut-il penser plus simplement que certaines protéases (1) sont douées d'un « pouvoir élastolytique » ? A propos de l'élastase isolée du *Flavobacterium elastolyticum*, Mandl et Cohen [5] ont pu parler de spécificité. Cette enzyme, en effet, après purification, n'attaque ni la caséine, ni l'hémoglobine, ni la gélatine. Elle hydrolyse seulement l'élastine et ses dérivés colorés (azoélastine). La même position, cependant, reste moins assurée avec l'élastase pancréatique (Lewis et coll. [3]).

Faut-il rappeler, par ailleurs, que, si les enzymes protéolytiques d'origine animale sont très rares qui sont capables de dissoudre l'élastine, assez nombreuses sont celles qui, venant du règne végétal, jouissent de cette propriété ? Par exemple, la papaine et la ficine. Le fait a été démontré par Thomas et Partridge [8] et, en ce qui concerne la papaine, par nous-mêmes.

RÉSUMÉ

Les auteurs ont mis en évidence le pouvoir élastolytique des filtrats de culture d'un germe appartenant au groupe *subtilis-mesentericus*, établi les meilleures conditions où ce pouvoir parvient à s'exercer, précisé la nature des conditions et des substances qui sont à même de l'activer ou, au contraire, de l'inhiber. L'enzyme élastolytique ainsi définie possède quelques caractères communs avec l'élastase pancréatique de Balo et Banga et les élastases récemment isolées d'*Actinomyces* et d'un *Flavobacterium*. Par contre, elle s'en sépare par d'autres caractères.

SUMMARY

ELASTOLYTIC ACTIVITY OF CULTURE FILTRATES FROM A BACILLUS BELONGING TO THE *subtilis-mesentericus* GROUP.

The authors show that culture filtrates from a bacillus belonging to the *subtilis-mesentericus* group are able to dissolve elastin. Best conditions of activity, activators and inhibitors are described. This new elastolytic enzyme has some common properties with the pancreatic elastase described by Balo and Banga and with elastases recently isolated from *Actinomyces* and *Flavobacterium*. But it differs from them by some other characters.

(1) Trypsine et α -chymotrypsine sont dépourvues de ce pouvoir.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALÓ (J.) und BANGA (I.). *Schweiz Z. Path. Bakt.*, 1949, **12**, 350.
- [2] BALÓ (J.) and BANGA (I.). *Bioch. J.*, 1950, **46**, 384.
- [3] LEWIS (U. J.), WILLIAMS (D. E.) and BRINK (N. G.). *J. biol. Chem.*, 1956, **222**, 705. — LAMY (F.), CRAIG (C. P.) and TAUBER (S.). *J. biol. Chem.*, 1961, **263**, 86. — NAUGHTON (M. A.) and SANGER (F.). *Bioch. J.*, 1961, **78**, 156.
- [4] MANDL (I.) and COHEN (B. B.). *Fed. Proc.*, 1960, **19**, 331.
- [5] MANDL (I.) and COHEN (B. B.). *Arch. Bioch.*, 1960, **94**, 47.
- [6] PARTRIDGE (S. M.), DAVIS (H. F.) and ADAIR (G. S.). *Bioch. J.*, 1955, **61**, 11.
- [7] SBARRA (A. J.), GILFILLAN (R. F.) and BARDAWIL (W. A.). *Fed. Proc.*, 1960, **19**, 144.
- [8] THOMAS (J.) and PARTRIDGE (S. M.). *Bioch. J.*, 1960, **74**, 600.
- [9] WAELCHLI (G.). *J. prakt. Chem.*, 1878, **47**, 71.

INFLUENCE DE LA PROTAMINE SUR LA MORPHOLOGIE DES BACTÉRIES

par G. MOUSTARDIER, Ch. DULONG de ROSNAY, P. DU PASQUIER
et J. LATRILLE (*).

(Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine, Bordeaux)

On sait que la protamine (Bizerte et coll. [1]), comme d'ailleurs les polypeptides et les histones [1, 6, 7], est douée *in vitro* d'un certain pouvoir bactériostatique. Cette action a été mise sur le compte d'une inhibition des processus de la respiration microbienne (Brandis [2]). Hénon et coll. [7]) avaient également envisagé la possibilité pour les polypeptides de provoquer dans l'organisme l'apparition de formes L, mais cette hypothèse n'avait pu être vérifiée.

Dans un travail antérieur (Moustardier et coll. [10]), nous avions déjà signalé que l'adjonction de sulfate de protamine à des cultures microbiennes entraînait un arrêt de la croissance des germes, et, dans certaines conditions, des modifications morphologiques importantes. Ces premiers essais avaient été effectués en bouillon ordinaire et avaient permis les constatations suivantes :

1^o En présence de faibles quantités de sulfate de protamine, le staphylocoque donne naissance à des éléments arrondis de forte taille ressemblant à des protoplastes.

2^o Les colibacilles présentent un aspect très voisin, de même d'ailleurs que les *Proteus*.

3^o *Bacillus megaterium*, s'il donne quelques formes rondes et isolées, a surtout tendance à se hérisser le long de ses parois de petites formations sphériques, qui peuvent se séparer du bacille, tout en lui restant reliées par de fins canalicules.

Il semblait donc que de très faibles quantités de protamine (de l'ordre du microgramme) affectaient la morphologie de bactéries très diverses. Mais, à côté des formes anormales, il persistait toujours des germes typiques très nombreux et seuls capables de se

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 13 avril 1961.

développer au cours des repiquages ultérieurs. C'est dans le but de préciser l'action de la protamine et d'obtenir des cultures pures de protoplastes que nous avons repris ces essais dans des conditions rigoureusement standardisées.

MATERIEL ET METHODES

1^o MILIEUX DE CULTURE.

a) *Induction.* — Toute notre expérimentation a été réalisée en milieu liquide. Nous avons été frappés d'emblée par le fait suivant : l'induction par la protamine de formes protoplastiques est remarquablement facile et constante dans les milieux à l'extrait de viande ; elle est au contraire très aléatoire dans les milieux à la peptone et dans les milieux cœur-cervelle. Après de nombreux essais, nous avons été amenés à utiliser le milieu B. P. G., tel qu'il a été décrit par Guillaume, Martin et Derieux [5] en 1959. Nous avons dilué ce milieu de moitié dans une solution aqueuse de saccharose à 40 p. 100.

b) *Réversion.* — Les tentatives de réversion de nos souches microbienues vers la forme normale ont été faites dans les milieux suivants :

1^o Milieu au thioglycolate Difco n° B 430, régénéré avant l'emploi par chauffage à 100° pendant trente minutes ;

2^o Milieu P. P. L. O. Difco n° B 412, additionné de 10 p. 100 de sérum (Difco B 441) ;

3^o Bouillon à l'extrait de viande, ajusté à pH 7,4 ;

4^o Gélose nutritive à 15 g p. 1 000 d'agar.

c) Le sulfate de protamine (1) a été incorporé aux milieux d'induction de façon à obtenir une concentration finale de 2, 10, 50, 100 µg/ml. Au moment de l'addition du sulfate de protamine, on note l'apparition d'un trouble transitoire.

d) Dans certaines expériences, nous avons utilisé d'autres ingrédients :

1^o *L'héparine* (Choay) a été purifiée avant l'emploi pour éliminer les antiseptiques qu'elle contenait : précipitation alcoolique, lavages successifs, redissolution en eau distillée.

2^o *Les extraits bactériens* ont été préparés selon la technique de Lederberg [8]. A partir de 3 grammes de culture d'un staphylocoque en milieu gélosé, on pratique une extraction par l'acide sulfurique 2 N. Après centrifugation, on neutralise le surnageant qui est prêt pour l'emploi après stérilisation.

(1) Aimablement fourni par la Maison Roche, que nous tenons à remercier.

2^o SOUCHES MICROBIENNES.

Nous avons fait nos essais avec deux souches de *Staphylococcus aureus* :

a) La souche 209 P de l'Institut Pasteur de Paris.

b) Une souche isolée récemment d'un malade atteint de furonculose.

3^o TECHNIQUE.

a) On commence par cultiver le germe en milieu B. P. G. saccharosé sans protamine. Les repiquages sont effectués en pleine phase logarithmique de croissance, avec un inoculum de 0,05 ml que l'on place dans le milieu contenant de la protamine au taux convenable.

b) On pratique ensuite des repiquages en séries : 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, etc., après le début de l'induction :

1^o Dans des milieux protaminés à la même concentration,

2^o Dans des milieux protaminés à une concentration supérieure,

3^o Dans des milieux sans protamine.

c) Les examens microscopiques ont été effectués :

1^o Soit entre lame et lamelle, en contraste de phase, avec ou sans fixation préalable. Dans ce dernier cas, on ajoute, volume à volume à la culture, une solution de formol à 20 p. 100 dans du tampon phosphate. On centrifuge après vingt minutes de contact, on lave deux fois le culot à l'eau distillée et on examine entre lame et lamelle.

2^o Soit après coloration par la méthode de Gram ou par la méthode de Giemsa (fixation dans les vapeurs d'acide osmique).

3^o Soit après coloration de Robinow [12] pour la mise en évidence des parois, après fixation au Bouin.

RESULTATS

I. — INDUCTION.

1^o Pour les concentrations de 2 et 10 µg/ml, au bout de douze à vingt-quatre heures, laousse est macroscopiquement normale et l'examen microscopique révèle une population hétérogène constituée d'éléments de grosseur différente, mais dont le repiquage sur milieu gélosé ordinaire donne naissance à des colonies normales de staphylocoques.

2^o A la concentration de 50 µg/ml, *au bout de deux heures d'incubation à 37°*, dans une zone qui se situe à l'union du tiers inférieur et des deux tiers supérieurs, on trouve déjà quelques élé-

ments gonflés, assez flous en contraste de phase, présentant après coloration au Giemsa une couleur chamois et une à trois granulations périphériques rouge vif (pl., fig. 1).

Au cours des vingt-quatre premières heures, les protoplastes deviennent de plus en plus nombreux, leur morphologie se modifie peu : leurs contours deviennent plus nets et les granulations acidophiles plus nombreuses (pl., fig. 2 et 3). La culture reste dans la zone d'anaérobiose et forme un anneau qui disparaît au bout de quarante-huit heures, temps après lequel les protoplastes ne persistent plus qu'au fond du tube.

Entre la deuxième et la vingt-quatrième heure après l'induction, les formes globuleuses obtenues sont repiquables dans les milieux B. P. G. contenant une quantité de protamine égale ou supérieure à celle qui a servi à l'induction. Mais les milieux ordinairesensemencés simultanément restent vierges, preuve qu'il n'existe plus de bactéries normales dans ces cultures.

Au contraire, *après trente-six à quarante-huit heures de culture*, si les repiquages sont toujours possibles en milieu B. P. G. saccharosé et protaminé, on commence à obtenir quelques colonies sur les milieux ordinaires, colonies normales de staphylocoques normaux. Ce phénomène de rebond, conduisant à une réversion spontanée, se traduit par des modifications morphologiques visibles à la coloration de Giemsa : les protoplastes chamois persistent, mais les granulations se sont multipliées à l'intérieur des corps globuleux et certaines sont libérées dans le milieu de culture. Peu à peu, ces granulations ont tendance à disparaître et sont remplacées par des cocci apparemment normaux et se colorant en bleu par le Giemsa (pl., fig. 4). Ces germes réversés sont incapables de se développer dans les milieux protaminés (qui restent absolument limpides) et ne peuvent être cultivés qu'après repiquage en milieu sans protamine, liquide ou solide. Le nombre des colonies qui poussent alors sur les milieux gélosés paraît grossièrement proportionnel au nombre de cocci normaux mis en évidence dans les milieux protaminés.

3° Pour des concentrations de 100 µg/ml de protamine, le processus de l'induction est exactement le même pendant les trente-six premières heures (pl., fig. 5 et 6).

Mais par la suite, on ne note *plus jamais de réversion spontanée*. Tandis que le repiquage en milieu protaminé est indéfiniment possible, l'ensemencement sur les milieux ordinaires reste toujours stérile.

L'aspect microscopique des éléments colorés au Giemsa montre que les protoplastes chamois et leurs granulations évoluent vers une sorte de maturation : multiplication des granulations acidophiles.

philes à l'intérieur du protoplaste, puis envahissement du milieu par des granulations isolées ou en amas, cependant que persistent des formes jeunes, comme si l'on assistait à une évolution par poussées successives (pl. fig. 7).

II. — REPIQUAGE DES PROTOPLASMES DANS LES MILIEUX PROTAMINÉS.

Nous avons vu que, pour des concentrations en protamine de 50 µg/ml, on pouvait assister, dans la primo-culture, à une réversion spontanée vers la forme normale après trente-six à quarante-huit heures de pousse. Mais, si l'on repique dès leur induction ces protoplastes dans un milieu protaminé neuf, la réversion spontanée devient impossible.

Cette irréversibilité est obtenue d'emblée si l'on pratique l'induction dans des milieux contenant 100 µg/ml de protamine : les repiquages en milieu sans protamine restent stériles.

A partir du moment où la culture des protoplastes est pure et irréversible, les repiquages successifs en milieux protaminés entraînent des modifications morphologiques :

Les granulations acidophiles disparaissent, aussi bien celles qui sont libres que celles qui sont dans les protoplastes. Les protoplastes eux-mêmes gardent leur teinte chamois au Giemsa, mais leurs contours sont de plus en plus nets ; ils semblent limités par une sorte de membrane et par un halo clair, particulièrement visible en contraste de phase, et se présentent généralement deux par deux ou en petits amas très réfringents (pl., fig. 8).

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Protoplastes après deux heures d'induction en présence de 50 µg/ml de protamine (Giemsa).

FIG. 2. — Protoplastes après six heures d'induction à 50 µg/ml (contraste de phase).

FIG. 3. — Protoplastes après vingt-quatre heures d'induction à 50 µg/ml (Giemsa).

FIG. 4. — Protoplastes en voie de réversion (Giemsa).

FIG. 5. — Protoplastes après six heures d'induction en présence de 100 µg/ml de protamine (contraste de phase).

FIG. 6. — Protoplastes après vingt-quatre heures à 100 µg/ml (Giemsa).

FIG. 7. — Protoplastes en voie de « maturation » (trente-six heures de pousse à 100 µg/ml) Giemsa.

FIG. 8. — Protoplastes repiqués huit fois à 100 µg/ml.

FIG. 9. — Protoplastes incomplètement réversés (Giemsa).

N. B. — Toutes les figures sont au même grossissement (environ $\times 4\,000$) sauf la figure 1 (environ $\times 5\,000$).



FIG. 1.



FIG. 2.



FIG. 3.

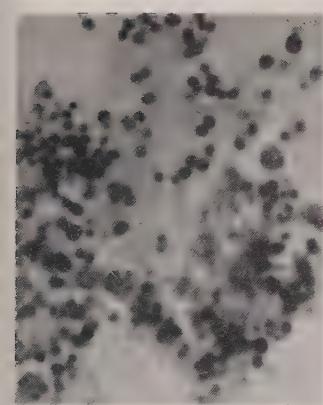


FIG. 4.

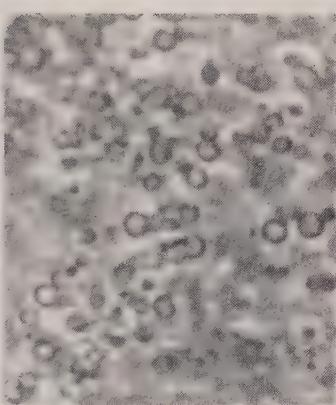


FIG. 5.

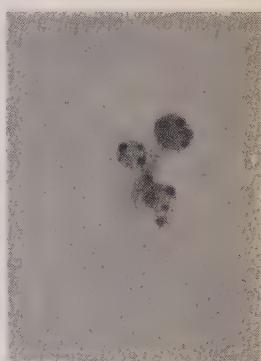


FIG. 6.

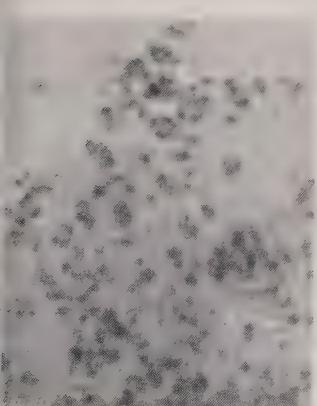


FIG. 7.



FIG. 8.

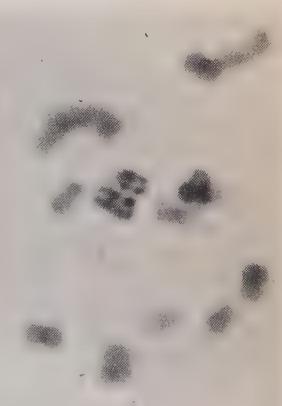


FIG. 9.

III. — VIEILLISSEMENT.

Le vieillissement en milieu protaminé à 100 µg/ml conduit d'ailleurs à un aspect voisin : tendance à une sorte d'enkystement des protoplastes, après disparition des granulations. Ces formes vieillies peuvent à tout moment être repiquées en milieu protaminé : elles se multiplient alors en vingt-quatre heures, en passant par toutes les phases du cycle d'induction que nous avons étudié plus haut. Cette vitalité persiste encore huit mois après la mise en route de la culture.

IV. — TENTATIVES DE RÉVERSION A PARTIR DES FORMES FIXÉES.

Chaque jour, parallèlement au repiquage en milieu protaminé, nous avons essayé d'obtenir une réversion en ensemencant :

- 1° Une gélose ordinaire,
- 2° Un bouillon à l'extrait de viande,
- 3° Un milieu PPLO,
- 4° Un milieu au thioglycolate.

On repique dans ces conditions le milieu protaminé du jour et le milieu de départ où se poursuit le vieillissement des protoplastes.

La culture reste toujours négative sur les milieux ordinaires et sur le milieu PPLO. Les milieux au thioglycolate ensemencés les cinq premiers jours restent vierges également. Par contre, ceux que l'on inocule à partir du sixième repiquage ou après une semaine de vieillissement sont le siège, après quarante-huit heures à soixante-douze heures d'incubation à 37°, d'un trouble granuleux qui apparaît, au début dans la zone d'anaérobiose stricte, puis tend à remonter dans la zone aérobie.

A ce stade, le repiquage de cette culture donne en milieu liquide ordinaire uneousse dense et en milieu gélosé des colonies nombreuses, blanchâtres et à tendance goniadale. L'examen à l'état frais révèle une morphologie intermédiaire entre celle du staphylocoque et celle du protoplaste. Aux colorations de Gram et de Giemsa, ces formes apparaissent comme de gros cocci volontiers en diplocoques ou en tétrades, dont certains n'ont pas de structure interne, alors que d'autres sont le siège d'une intense activité chromatinienne visible sans hydrolyse préalable : chromatine d'aspect monstrueux, répartie en deux pôles, en couronne ou en digitations symétriques. Parfois un septum accusé sépare les deux parties du germe (pl., fig. 9).

Le repiquage de ces formes est facile sur tous les milieux, mais, malgré de nombreux repiquages successifs, il ne nous a pas été possible d'affirmer le retour à un staphylocoque morphologiquement tout à fait normal. Il faut reconnaître que la distinction au microscope entre un coccus normal et les formes en voie de réversion, ou en réversion incomplète, est très difficile, surtout lorsque ces différents éléments coexistent.

Nous avons essayé de faire la preuve de cette réversion par l'étude des caractères biochimiques et nous avons obtenu les résultats suivants :

	AVANT INDUCTION	APRÈS RÉVERSION
Pigmentation	—	—
Pousse sur Chapman	+	+
Fermentation du mannitol sur Chapman	—	—
Coagulase	+ en 1/2 h.	+ en 8 h.
Phosphatase	+	+
Gélatinase	+	—
Catalase	+	+
<i>Fermentations sucrées :</i>		
Glucose	+	—
Maltose	+	—
Galactose	+	—
Lactose	+	—
Lévulose	+	—
Saccharose	+	—
Arabinose	—	—
Xylose	—	—
Dulcitol	—	—

Il existe donc des différences assez sensibles entre la souche de départ (une souche fraîchement isolée) et le germe après réversion. Mais au fur et à mesure du vieillissement dans les milieux pour fermentations sucrées, nous avons noté la prédominance progressive de cocci se rapprochant beaucoup des staphylocoques normaux, cependant que les sucres finissaient par être attaqués, comme par la souche de départ.

V. — PROPRIÉTÉS DES « PROTOPLASTES-PROTAMINE ».

A la suite des travaux de Wolf et Brignon [15], qui montrèrent que l'héparine et l'acide ribonucléique se combinent avec le sulfate de protamine dans des proportions stoechiométriques, nous avons recherché l'action de ces substances sur l'induction et l'éventuelle réversion des protoplastes.

1^o Action de l'héparine.

Si l'on ajoute de l'héparine (25 unités/ml) dans le milieu B. P. G.-saccharosé-protaminé au moment de l'ensemencement, l'induction de protoplastes est impossible et la culture donne naissance à des staphylocoques normaux.

Si l'on ajoute l'héparine après l'induction, une quantité infime suffit à faire disparaître totalement l'opacification du milieu et cet éclaircissement correspond à la disparition des protoplastes.

Si l'on remet ensuite ce milieu, apparemment privé de toute culture, pendant vingt-quatre heures à 37°, plusieurs éventualités peuvent se produire, selon le moment de la vie des protoplastes où l'on est intervenu :

a) Lorsque l'on ajoute l'héparine après une induction de vingt-quatre heures en présence de 100 µg/ml de protamine, l'incubation à 37° permet la pousse de staphylocoques normaux, pigmentés, repiquables sur les milieux ordinaires. Il s'agit d'une réversion vraie.

b) Lorsque l'on ajoute l'héparine après une induction de quarante-huit heures, on obtient également une pousse secondaire, mais cette fois l'on retrouve les formes pseudo-réversées précédemment décrites. Ces formes sont parfaitement repiquables en milieux ordinaires, mais restent non pigmentées.

c) Enfin, lorsque l'on ajoute l'héparine à une culture de protoplastes vieillis, ils ne se laissent pas « dissoudre » par cette agression, mais ils se modifient sensiblement, tendant à devenir opaques en contraste de phase et formant des « ghosts » assez nombreux. Ils ne sont pas repiquables en l'absence de protamine.

2^o Action des extraits bactériens.

L'addition d'un extrait sulfurique de culture de staphylocoque conduit également à un éclaircissement du milieu, correspondant à la lyse des protoplastes. Cependant l'incubation poursuivie après l'adjonction de cet extrait ne donne aucune pousse secondaire.

3^o Filtrabilité.

La filtration a été réalisée aux stades de début de l'induction sur filtre Seitz ESK à 50 p. 100 d'amiante et sur bougie L3, sous une pression maximum de 30 cm d'eau et pendant trois minutes, après imprégnation convenable du filtre. Dans ces conditions, le filtrat ne donne aucune pousse sur les milieux ordinaires. Mais ensemencé en milieu B. P. G.-saccharosé-protaminé, il redonne des protoplastes jeunes, qui évoluent par la suite comme nous l'avons vu plus haut.

4^e Résistance au choc osmotique.

A divers moments de leur vie, nous avons soumis les protoplastes à l'agression du choc osmotique en eau distillée après deux lavages successifs. Cela n'a entraîné aucune modification morphologique ni culturelle ; en particulier nous n'avons pas noté l'apparition de « ghosts », comme il est classique d'en rencontrer avec d'autres protoplastes. Cela rejoint les constatations de Mager [9] et de Colobert [4] à propos du rôle protecteur de la protamine sur les protoplastes obtenus avec la pénicilline.

DISCUSSION

Nous avons cherché, pour avoir plus de précision sur ces structures, à obtenir des cultures pures de protoplastes à partir d'autres germes : bacilles à Gram positif comme *B. megaterium*, ou à Gram négatif comme *Escherichia coli* 0111 B4. Dans tous ces cas, avec la même méthode d'induction, nous avons obtenu le même résultat et les protoplastes présentent les mêmes propriétés que ceux que nous avons décrits pour le staphylocoque.

L'induction « one step » est satisfaisante. Néanmoins, il vaut mieux opérer en deux temps : un premier passage à 50 µg/ml, puis un second à 100 µg/ml.

Nous avons également essayé d'obtenir des protoplastes avec la protamine, selon la méthode que Chargaff [3] a utilisée pour la pénicilline : les résultats obtenus par cette technique sont rigoureusement les mêmes qu'avec la méthode d'induction lente qui sert de base à notre étude.

Il semble donc que la protamine soit capable par n'importe quelle méthode, et avec des germes divers, d'induire la formation de protoplastes dont l'évolution et la réversion présentent les mêmes caractères. Ces éléments sphériques se rapprochent aussi bien des protoplastes obtenus avec le lysozyme (Salton [13]) que de ceux obtenus avec la pénicilline (Lederberg et Saint-Clair [8]), par leur mode d'induction, leur morphologie, leur culture en anaérobiose. Mais ils s'en distinguent par des caractères très importants :

1^o Ils sont insensibles au choc osmotique.

2^o Ils sont indéfiniment repiquables sous la même forme.

3^o Par vieillissement sans repiquage, ils sont d'une longévité considérable et gardent leur vitalité.

4^o Ils sont réversibles, mais la réversion est impossible à obtenir par simple suppression de l'inducteur ; il faut faire des repi-

quages souvent nombreux sur des milieux spéciaux. Cette réversion paraît très progressive.

Nous avons appelé ces corps sphériques des *protoplastes*, en prenant ce terme dans son sens le plus large, sans préjuger de ce qui se passe exactement au niveau de la paroi bactérienne, et bien qu'ils ne soient pas sensibles au choc osmotique. Nous avons préféré utiliser le terme le plus général, bien que nous empruntons ainsi un vocable qui répond depuis quelques années à une définition très stricte (Mc Quillen [11]).

RÉSUMÉ

Le sulfate de protamine, déjà connu pour ses propriétés antibactériennes et son action protectrice sur les protoplastes, a également des propriétés inductrices de formes anormales. Ces formes, que nous appelons protoplastes, ont été étudiées surtout à propos du staphylocoque et ressemblent à la fois aux formes décrites après action du lysozyme et de la pénicilline, mais en diffèrent par :

1^o Leur résistance au choc osmotique.

2^o Le caractère progressif et souvent incomplet de leur réversion.

3^o Leur longévité et le fait qu'elles sont indéfiniment repiquables en milieu protaminé.

Le staphylocoque s'étant révélé un matériel d'étude difficile, nous espérons obtenir plus de précisions quant au mode d'action de la protamine, avec des germes plus faciles à examiner au microscope et pouvant mieux traduire le détail de leurs modifications.

SUMMARY

INFLUENCE OF PROTAMINE ON THE MORPHOLOGY OF BACTERIA

Protamine sulfate, apart from its antibacterial properties and its protective action on protoplasts, may induce abnormal bacterial forms.

The authors study these forms in staphylococci and call them protoplasts. They resemble to the forms induced by lysozyme and penicillin, but differ from them by :

1. Their resistance to osmotic shock.
2. Their progressive and often incomplete reversion.
3. Their longevity and the fact that their subcultures are indefinitely possible in protamine media.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BIZERTE (G.), TACQUET (A.), LECLERC (H.) et SAUTIERE (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1959, **153**, 1790.
- [2] BRANDIS (H.) and THOFERN (E.). *Naturwiss.*, 1960, **47**, 88.
- [3] CHARGAFF (E.), SCHULMAN (H. M.) and SHAPIRO (H. S.). *Nature*, 1957, **180**, 851.
- [4] COLOBERT (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 37.
- [5] GUILLAUME (J.), MARTIN (G.) et DERIEUX (J. C.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1959, **41**, 159.
- [6] HÉNON (M.), PELLETIER (M.) et DELAUNAY (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 710.
- [7] HÉNON (M.), PELLETIER (M.) et DELAUNAY (A.). *Sem. Hôp. Paris, Path. Biol.*, 1960, **8**, 715.
- [8] LEDERBERG (J.) and SAINT-CLAIR (J.). *J. Bact.*, 1958, **75**, 148.
- [9] MAGER (J.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1959, **36**, 529.
- [10] MOUSTARDIER (G.), DULONG DE ROSNAY (Ch.), DU PASQUIER (P.) et LATRILLE (J.). *Journées Françaises de Biologie Médicale*, Toulouse, juin 1960 ; *Sem. Hôp., Path. Biol.*, 1961 (sous presse).
- [11] QUILLEN (K. Mc.) in GUNSALUS (I. C.) and STANIER (R. Y.). *The bacteria*, Vol. I, p. 249. Academic Press., New York, 1960.
- [12] ROBINOW (C. P.) and MURRAY (R. G. E.). *Exp. Cell Res.*, 1953, **4**, 390.
- [13] SALTON (H. R. J.). in *The bacteria*, Vol. I., p. 148. Academic Press., New York, 1960.
- [14] TULASNE (R.), MINCK (R.), KIRN (A.) et KREMBEL (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 859.
- [15] WOLFF (R.) et BRIGNON (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 1125.

ÉTUDE COMPARÉE DE L'EFFET BACTÉRICIDE DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES A BASE DE COLISTINE SUR LES ENTÉROBACTÉRIACÉES ET PSEUDOMONADACÉES

par R. CLUZEL, J. MICHEL, R. VAURS et M. CLUZEL-NIGAY (*).

(*Laboratoire de Bactériologie et Hygiène, Faculté de Médecine,
Clermont-Ferrand*)

Comme chaque antibiotique, la colistine a suscité un grand nombre de travaux. Le Colloque de la Société Française de Microbiologie du 3 novembre 1960, consacré aux antibiotiques du groupe polymyxine-colistine, a fait le point sur un certain nombre d'aspects de l'activité de la colistine. Son spectre antibactérien est bien connu [2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13], de même que les modalités de son action [16] et les caractères de la résistance à son égard [6, 10, 14, 15]. Les associations de la colistine avec d'autres antibiotiques ont fait l'objet de plusieurs études, en particulier celle de Chabbert, qui a précisé d'une part les courbes d'effet bactériostatique de ces associations [3, 4] et, d'autre part, leur pouvoir bactéricide par une technique en milieu liquide [3].

La colistine constituant une arme de choix dans la lutte contre Entérobactériacées et Pseudomonadacées, nous avons étudié le pouvoir bactéricide des associations à base de colistine sur différentes souches appartenant à ces deux familles bactériennes.

Nos expériences ont été réalisées suivant la technique de la « disposition en croix » dérivée du transfert sur cellophane (Cluzel et coll. [7]). Nous avons essayé sur 10 souches d'Entérobactériacées et de Pseudomonadacées toutes les associations entre la colistine et les différents antibiotiques auxquels chaque souche est sensible. Les bandes imprégnées d'antibiotiques ont été préparées à l'aide des solutions suivantes :

Streptomycine (S), 1 666 µg/cm³ ; kanamycine (K), 1 000 µg/cm³ ; néomycine (N), 2 200 µg/cm³ ; framycétine (F), 2 000 µg/cm³ ;

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 13 avril 1961.

auréomycine (A), 500 µg/cm³; tétracycline (T), 200 µg/cm³; terramycine (O), 200 µg/cm³; chloramphénicol (C), 1 000 µg/cm³; polymyxine (Po), 1 000 µg/cm³; colistine (Co), 7 500 U/cm³.

Les résultats, simplement désignés par synergie (S), addition (Ad), indifférence (I) et antagonisme (A), sont rassemblés dans le tableau I.

On voit que l'effet obtenu est assez constant quelle que soit la souche considérée pour les associations de colistine avec poly-

TABLEAU I.

	E. COLI	E. COLI O: III B4	KLEBS. PNEUM.	EBERTH. TYPHOSA	SALM. PARA B		SHIG. SONNEI	PSEUDOMONAS AERUG.		
					1	2		1	2	3
Co-S.	S		I			S	I	I	I	S
Co-K.	I	I		S			I			
Co-N.	I	I		I		I	I	I		I
Co-F.	S			S		I		I		
Co-A.	S			S	S	S				
Co-T.	I			I	I	S	S			
Co-O.	I			I	I	I				
Co-C.	S		S	S		S	S			
Co-Po	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad

myxine, néomycine, auréomycine ou chloramphénicol. Cet effet est variable pour les autres associations. On remarque en outre que pour les trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* nous n'avons obtenu qu'une synergie (association colistine-streptomycine).

Dans le tableau II, nous avons groupé les différents résultats des 9 associations possibles.

Il est facile de constater que l'indifférence se rencontre dans la moitié des cas environ, et que la synergie est assez fréquente. En revanche, et c'est là un point intéressant, nous n'avons rencontré aucun antagonisme.

Considérons maintenant les différentes associations prises isolément.

1^o Association avec la polymyxine : les résultats que nous avons toujours obtenus correspondent à un effet d'addition comme le montrent les figures 1 et 2. L'association colistine-polymyxine donne une image semblable à celle donnée par deux bandes de colistine (fig. 1 et 2).

2^o Association avec la streptomycine, la kanamycine, la néomycine et la framycétine : la fréquence des synergies va en décroissant selon l'ordre suivant : framycétine, streptomycine, kanamycine et néomycine.

3^o Association avec les antibiotiques du groupe des tétracyclines : l'effet de l'association varie dans de très fortes proportions suivant

TABLEAU II.

	NOMBRE D'ASSOCIATIONS	S	Ad	I	A
Co-S	7	3	0	4	0
Co-K	4	1	0	3	0
Co-N	7	0	0	7	0
Co-F	4	2	0	2	0
Co-A	4	4	0	0	0
Co-T	5	2	0	3	0
Co-O	4	0	0	4	0
Co-C	5	5	0	0	0
Co-Po	10	0	10	0	0
Résultats.....	50	17	10	23	0

l'antibiotique utilisé. En effet, si l'association colistine-auréomycine s'est montrée synergique dans tous les cas, le pourcentage des synergies tombe avec la tétracycline et s'annule avec la terramycine.

4^o Association avec le chloramphénicol : nous avons un résultat particulièrement intéressant. Effectivement, cette association s'est montrée synergique dans tous les cas étudiés. Cette synergie est très nette sur la souche de *Shigella sonnei* (fig. 2) et sur celle d'*Eberthella typhosa* (fig. 1), où des concentrations faibles de colistine suffisent à empêcher l'apparition de survivants. Par contre, la synergie est moins évidente sur la souche de *Salmonella paratyphi* B et le nombre de survivants au chloramphénicol est plus important (fig. 3).

On note également sur les figures 1, 2 et 3 les pouvoirs bactéricides en valeur absolue de la colistine, de la polymyxine et de la framycétine, notion certes bien classique.

Au terme de cette étude, il nous semble intéressant de dégager quelques points particuliers. L'association de la colistine avec



FIG. 1.



FIG. 2.

d'autres antibiotiques semble favorable dans un certain nombre de cas. A cet égard, les associations colistine-chloramphénicol et colistine-auréomycine nous paraissent spécialement efficaces. L'antagonisme semble très rare.

Il est un point sur lequel nous voudrions insister : c'est le parallélisme d'action entre la colistine et la polymyxine. Conjointement à l'étude des associations de la colistine, nous avons réalisé les



FIG. 3.

mêmes expériences en remplaçant cet antibiotique par la polymyxine sur les souches d'Entérobactériacées et de Pseudomonadacées déjà étudiées. Les résultats, groupés dans les tableaux III et IV, sont semblables à ceux des tableaux I et II.

Dans l'ensemble, les résultats présentent une grande similitude, en particulier quant à l'absence d'antagonisme et la valeur des associations avec le chloramphénicol et l'auréomycine. Cependant il faut noter que les synergies sont un peu moins fréquentes.

Il semble donc qu'à l'analogie de structure entre ces deux antibiotiques (Bizerte et Dautrevaux [1]) corresponde une action équivalente, ce qui rejoint les conclusions apportées par Chabert [3]. Ceci est illustré de manière particulièrement frappante

par les figures 1, 2 et 3, qui révèlent une symétrie presque parfaite des images associant le chloramphénicol et la colistine d'une part, le chloramphénicol et la polymyxine d'autre part.

TABLEAU III.

	E. COLI	E. COLI O: III B4	KLEBS. PNEUM.	EBERTH. TYPHOSEA	SALM. PARA B		SHIG. SONNEI	PSEUDOMONAS AERUG.		
					I	2		I	2	3
Po-S .	I		I			S	I	I	I	I
Po-K .	I	I		S			I		I	I
Po-N .	I	I		I		I	I	I	I	I
Po-F .	I		S	I		I		I		
Po-A .	S		S	S	S	S				
Po-T .	I		I	I	S					
Po-O .	I		I	I	I	S				
Po-C .	S	S	S	Ad	S	S	Ad	Ad	Ad	Ad
Po-Co.	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad

TABLEAU IV.

	NOMBRE D'ASSOCIATIONS	S	Ad	I	A
Po-S	7	I	o	6	o
Po-K	4	I	o	3	o
Po-N	7	o	o	7	o
Po-F	4	I	o	3	o
Po-A	4	4	o	o	o
Po-T	5	2	o	3	o
Po-O	4	o	o	4	o
Po-C	5	5	o	o	o
Po-Co.....	10	o	10	o	o
Résultats.....	50	14	10	26	o

RÉSUMÉ.

L'efficacité restreinte d'un bon nombre d'antibiotiques vis-à-vis des Entérobactériacées et des Pseudomonadacées nous a amenés à étudier le pouvoir bactéricide des associations à base de colistine. Par la technique de la « disposition en croix » dérivée du transfert sur cellophane, nous avons envisagé l'effet de 50 associa-

tions sur 10 souches appartenant aux deux familles bactériennes considérées.

Nous n'avons pas noté d'antagonisme, alors qu'il semble intéressant de souligner l'effet synergique des associations colistine-chloramphénicol et colistine-auréomycine. Le parallélisme d'activité entre polymyxine et colistine est particulièrement net.

SUMMARY

COMPARATIVE STUDY OF THE BACTERICIDAL EFFECT OF ANTIBIOTIC ASSOCIATIONS CONTAINING COLISTIN AS THE BASIC SUBSTANCE ON *Enterobacteriaceae* AND *Pseudomonadaceae*.

The limited efficacy of a great number of antibiotics on *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* induced us to study the bactericidal power of antibiotic associations containing colistin as the basic substance. With the « cross-like disposition » technique, derived from the transfer on cellophane, we have considered the effect of 50 associations on 10 strains belonging to these two bacterial families. We have noted no antagonism whereas it seems interesting to point out the synergic effect obtained with the associations colistin-chloramphenicol and colistin-aureomycin. The parallelism between the activity of polymyxin and that of colistin is particularly marked.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BIZERTE (G.) et DAUTREVAUX (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1957, paru 1958, **151**, 1888-1889.
- [2] BOURSE (R.) et MONNIER (J.-J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro d'avril, p. 7.
- [3] CHABBERT (Y.). *Minerva med.*, 1958, **2**, 4482.
- [4] CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro d'avril, p. 53.
- [5] CHABBERT (Y.). Coll. III/8 in *Huit Colloques de Biologie clinique III^e Congrès intern. Biol. clin.* Bruxelles, juillet 1957, 141-188. Presses Académiques Européennes, Bruxelles, 1958.
- [6] CHABBERT (Y.) et PATTE (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro d'avril, p. 44.
- [7] CLUZEL (R.), VAURS (R.), CLUZEL-NIGAY (M.) et VERNER (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 928-932.
- [8] COURTIEU (A.-L.), BOULEZ (N.), CHASSIGNOL (S.) et BOTTA (J.-M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro d'avril, p. 67.
- [9] COURTIEU (A.-L.), MONNIER (J.-J.), LAJUDIE (P. DE) et GUILLEMET (F. N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro d'avril, p. 14.

[10] HIRSH (H. A.), MC CARTHY (C. G.) and FINLAND (M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1960, **103**, 338-342.

[11] LUTZ (A.), SCHAEFFER (A.) et HOFFERER (M. J.). *Ann. Int. Pasteur*, 1958, **95**, 49-61.

[12] LUTZ (A.) et SCHAEFFER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 57-63.

[13] MARTIN (R.), SUREAU (B.), CHABBERT (Y.), MARTIN (L.) et HUTINEL (B.). *Rev. Méd. Fr.*, 1959, **40**, 105-115.

[14] MOIRAGHI et RUGGENINI (A.). *Minerva Med.*, 1956, **47**, 836-839.

[15] MONNIER (J.-J.) et BOURSE (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961. Suppl. au numéro d'avril, p. 59.

[16] PATTE (J.-C.) et CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro d'avril, p. 32.

RECHERCHES SUR LE COMPORTEMENT FERMENTATIF DES BACILLES TYPHIQUES

A L'ÉGARD DU XYLOSE NATUREL D(+) ET DE SON INVERSE OPTIQUE L(-)

par Pierre NICOLLE, Jacques NICOLLE et Gisèle DIVERNEAU (*)
(avec la collaboration technique d'Anne-Marie du PLESSIS
et Joëlle COIGNARD).

LES CHIMIOTYPES DE *SALMONELLA TYPHI*.

Kristensen (1926 [8], 1938 [9]) a décrit trois variétés biochimiques du bacille typhique : le chimiotype I utilise le xylose (1), mais non l'arabinose ; le chimiotype II respecte ces deux sucres ; le chimiotype III les décompose l'un et l'autre. De Blasi et Buogo [1] ont admis un quatrième chimiotype qui agit sur l'arabinose et laisse le xylose intact.

Une longue expérience de la méthode de Kristensen (2) nous conduit à mettre en doute l'existence des chimiotypes III et IV (Nicolle [12]) : chaque fois que nous avons constaté la décomposition de l'arabinose, nous avons pu prouver que cette réaction était due non au bacille typhique, mais à un contaminant. Pour nous, comme pour la majorité des auteurs allemands, seule compte la réaction du xylose. La méthode ne permet donc de reconnaître que deux chimiotypes parmi les bacilles typhiques : le chimiotype I, xylose positif et le chimiotype II, xylose négatif. Cependant, il nous paraît utile de maintenir l'épreuve de l'arabinose comme contrôle de la pureté des souches.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 13 avril 1961.

(1) Dans tous les cas où le sens du pouvoir rotatoire des sucres n'est pas précisé, il s'agit des isomères D(+) pour le xylose et L(+) pour l'arabinose.

(2) La méthode de Kristensen consiste à cultiver les souches de bacille typhique en eau peptonée additionnée de xylose ou d'arabinose à la concentration de 5 g pour 1 000 cm³ et de quelques gouttes d'une solution alcoolique de bleu de bromothymol. Si l'un des sucres est attaqué, il se forme de l'acide lactique. L'acidité apparue fait virer au jaune l'indicateur. Kristensen considère comme xylose positive ou arabinose positive toute culture devenue franchement jaune en moins de trois jours et comme xylose négative ou arabinose négative toute culture restée bleue ce délai passé.

Kristensen a beaucoup insisté sur l'intérêt que présentait sa méthode de subdivision biochimique des souches de bacille typhique en épidémiologie : les types biochimiques, d'après lui et d'après plusieurs autres auteurs, sont stables, aussi bien au cours de leurs passages d'individu à individu qu'au cours des repiquages sur les milieux artificiels.

En raison de cette stabilité *in vivo* et *in vitro*, lorsqu'un malade ou un porteur de germes contamine une ou plusieurs personnes autour de lui, les bacilles isolés de ces personnes et du malade lui-même ou du porteur seront nécessairement du même chimiotype.

Il s'ensuit que, si l'on trouve des bacilles de chimiotypes différents chez des personnes vivant dans une même région, on peut en déduire qu'il n'y a eu aucune relation de contagion entre elles. Autrement dit, la méthode biochimique présente une indiscutable valeur dans l'étude épidémiologique de la fièvre typhoïde. Malheureusement, comme nous l'avons dit plus haut, le nombre des chimiotypes est réduit à quatre d'après de Blasi et Buogo, à trois d'après Kristensen et à deux seulement d'après les auteurs allemands, Chomiczewski [3] et nous-même (Nicolle [12]) et d'autre part, leurs fréquences respectives sont très inégales. Ces deux circonstances réduisent considérablement l'intérêt que la méthode peut présenter lorsqu'elle est employée seule.

Nous verrons plus loin qu'en revanche, lorsqu'on l'associe à la lysotypie par la méthode de Craigie et Felix ou aux lysotypes complémentaires du lysotype A et du groupe I + IV par les méthodes que nous avons proposées, elle peut rendre de très appréciables services.

FRÉQUENCE RESPECTIVE
DES DEUX CHIMIOTYPES DU BACILLE TYPHIQUE
POUR L'ENSEMBLE DES SOUCHES ÉTUDIÉES.

Le Centre français de la Lysotypie Entérique (Institut Pasteur, Service des Bactériophages) a reçu, de 1954 à 1960 inclus, 9 453 souches de bacille typhique provenant de plusieurs pays d'Europe, d'Afrique, d'Asie et d'Amérique. Les pourcentages des deux chimiotypes pour l'ensemble de ces souches ont été de 72,99 pour le chimiotype I et de 27 pour le chimiotype II. Ces résultats sont voisins de ceux qui ont été publiés en 1950 par Lachowicz et Buczowski [10] pour 712 souches isolées de 405 cas de fièvre typhoïde dans les régions de Gdansk et de Gnydia : chimiotype I : 74,8 p. 100 ; chimiotype II : 23 p. 100 ; chimiotype III : 0,7 p. 100 ; chimiotype indéterminé : 0,7 p. 100 ; réaction douceuse : 0,5 p. 100, et de ceux qui ont été donnés ici-même par Marie Pavlatou avec l'un d'entre nous (Pavlatou et Nicolle [21]),

en 1953, pour 1 069 souches de provenance très variée (71,7 p. 100 pour le chimiotype I et 27,1 p. 100 pour le chimiotype II). Ils sont un peu différents, au contraire de ceux que Kristensen [9] a donnés en 1938 pour 2 118 souches danoises (chimiotypes I : 78,75 p. 100, chimiotype II : 21,2 p. 100) et de ceux de Brandis et Maurer [2] pour 1 493 souches allemandes (chimiotype I : 81,4 p. 100 ; chimiotype II : 18,6 p. 100).

La raison de l'écart qui existe entre nos résultats et ceux des auteurs danois et allemands s'expliquera d'elle-même au paragraphe suivant : nos souches provenaient de pays très divers, parmi lesquels figuraient plusieurs régions de l'Afrique Noire où les pourcentages des souches xylose négatives sont relativement élevés. Cette circonstance a donc contribué à abaisser assez sensiblement le pourcentage des souches xylose positives dans notre total.

Mais pour les souches isolées en France et dans d'autres pays d'Europe, on remarquera que nos pourcentages ont atteint un niveau à peu près égal à celui des pourcentages des autres auteurs européens, les polonais exceptés.

FRÉQUENCE RESPECTIVE
DES DEUX CHIMIOTYPES DU BACILLE TYPHIQUE
SUIVANT LES RÉGIONS GÉOGRAPHIQUES CONSIDÉRÉES (tableau I).

Les résultats qui figurent au tableau I montrent que les bacilles typhiques xylose positifs prédominent fortement au Vietnam et au Cambodge, puisqu'en gros ils comprennent les quatre cinquièmes

TABLEAU I.

RÉGIONS GÉOGRAPHIQUES	SOUCHE XYLOSE-POSITIVES		SOUCHE XYLOSE-NÉGATIVES	
	Nbre	%	Nbre	%
France	824	78,55	225	21,44
Autres pays d'Europe	948	78,93	253	21,06
Afrique du Nord	1119	76,53	343	23,46
Sénégal	344	54,17	291	45,82
Congo (Léopoldville)	760	62,70	452	37,29
Madagascar	777	67,68	371	32,39
Turquie, Iran	304	66,66	152	33,33
Vietnam, Cambodge	1439	80,52	348	19,47
Mexique, Venezuela, Pérou	385	76,54	118	23,45
Total	6900	72,99	2553	27,00

des souches de ces pays. Ils forment encore la grande majorité des souches de France et des autres pays d'Europe (on notera la remarquable similitude des pourcentages obtenus pour la France et l'ensemble des autres pays d'Europe qui nous ont envoyé des souches : Allemagne, Autriche, Belgique, Espagne, Italie, Grèce), pour l'Afrique du Nord, le Mexique, le Venezuela et le Pérou : plus des trois quarts des souches de ces pays appartiennent au chimiotype I. La prépondérance de ce chimiotype est un peu plus faible au Congo (Léopoldville) et à Madagascar (les deux tiers et même un peu moins). Enfin, au Sénégal, son nombre dépasse de peu celui des bacilles xylose négatifs (à peine plus de la moitié).

Ces différences dans les proportions respectives des deux chimiotypes de *S. typhi* suivant les pays ou les régions considérés se retrouvent le plus souvent, malgré le nombre quelquefois assez faible des souches et les variations provoquées par les épidémies,

TABLEAU II.

PAYS OU RÉGIONS	ANNÉES OU GROUPES D'ANNÉES	TOTAL DES SOUCHES ÉTUDIÉES	POURCENTAGES DES CHIMIOTYPES	
			I	II
FRANCE	1954	293	90,44	9,55
	1955 et 1956	248	81,55	18,14
	1957 et 1958	174	72,98	27,01
	1959 et 1960	334	68,50	31,43
EUROPE	1954	292	74,63	25,34
	1955 et 1956	506	76,87	23,12
	1957 et 1958	232	83,18	16,81
	1959 et 1960	171	86,54	13,45
AFRIQUE DU NORD	1954	298	70,13	29,86
	1955 et 1956	366	75,13	24,86
	1957 et 1958	494	79,75	20,24
	1959 et 1960	304	79,27	20,72
VIETNAM	1954	248	79,43	20,55
	1955 et 1956	558	77,95	22,04
	1957 et 1958	496	84,27	15,72
	1959 et 1960	485	80,20	19,79
SÉNÉGAL	1954 et 1955	123	56,91	43,08
	1956 et 1958	216	49,07	50,92
	1959 et 1960	296	56,75	43,24

lorsqu'au lieu de considérer les pourcentages par région pour la période entière de 1954 à 1960, on les examine par années ou mieux par groupes de deux années (tableau II).

Ainsi, l'on peut constater que les pourcentages biennaux du chimiotype I ont toujours été très élevés en Europe, en Afrique du Nord, au Vietnam, et au contraire toujours moins élevés au Sénégal.

FRÉQUENCE RESPECTIVE DES DEUX CHIMIOTYPES
PARMI DES SOUCHES APPARTENANT A DIVERS LYSOTYPES
DU BACILLE TYPHIQUE.

Nous avons déjà signalé (Pavlatou et Nicolle [21]) et plusieurs autres auteurs également, en particulier Olitzki et coll. [19], Jude et Nicolle [6], de Blasi et Buogo [1], Lachowicz et Buczowski [40],

TABLEAU III.

LYSOTYPES	CHIMIOTYPE I		CHIMIOTYPE II	
	Nombre	%	Nombre	%
A	1349	55,67	1074	44,32
B ₂	4	11,42	31	88,57
C ₁ et C ₁ (C.A.)	397	99,74	1	0,25
C ₄	80	100	—	—
D ₁	263	95,28	13	4,71
D ₂	123	99,19	1	0,80
D ₄	19	100	—	—
D ₆	9	16,98	44	83,01
E ₁	1964	99,59	8	0,40
E ₄	27	87,09	4	12,90
E ₉	45	100	—	—
E ₁₀	41	100	—	—
F ₁	128	98,46	2	1,53
G	176	99,43	1	0,56
J ₁	55	100	—	—
J ₃	21	100	—	—
M ₁	—	—	224	100
M ₂	—	—	22	100
M ₃	—	—	8	100
N	105	66,03	54	33,96
O	8	6,29	119	93,70
T	69	77,52	20	22,47
37	44	100	—	—
40	—	—	39	100
42	—	—	47	100
n.t.	427	81,33	98	18,66
aliéno-sensibles	700	61,84	431	38,10
Vi-	255	76,34	79	23,65

nt = souches non lysotypables, insensibles à toutes les préparations adaptées actuellement utilisées du phage Vi II.

aliéno-sensibles = souches d'une sensibilité anarchique aux préparations adaptées.

Vi- = souches Vi négatives non lysotypables pour cette raison.

Brandis et Maurer [2], Chomiczewski [3], que certains lysotypes du bacille typhique (3) étaient biochimiquement homogènes, c'est-à-dire que la totalité ou la presque totalité de leurs souches donnaient les réactions d'un même chimiotype tandis que d'autres lysotypes, biochimiquement hétérogènes, comprenaient à la fois des souches xylose positives et des souches xylose négatives.

Depuis notre publication de 1953 sur ce sujet, les données que nous avons accumulées ont confirmé et complété nos résultats antérieurs (tableau III). Le tableau III montre que les lysotypes A, C1 et sa variété centre africaine [C1, C. A.] (Nicolle et coll. 1955 [18]), C4, D2, D4, E1, E4, E9, E10 (Nicolle et coll. [15]), F1, G, J1, J3 [15] et 37 [15] sont biochimiquement homogènes ou presque homogènes; leurs souches sont xylose positives. En revanche, les lysotypes M1, M2 [15], M3 [15], 40 et 42 (Spano [23]), également biochimiquement homogènes, ne comprennent que des souches xylose négatives.

D'autre part, les lysotypes A, D1, N et T sont biochimiquement hétérogènes avec prédominance du chimiotype I (xylose-positif), tandis que les lysotypes B2, D6 et 0, biochimiquement hétérogènes, présentent une prédominance du chimiotype II (xylose-négatif).

FRÉQUENCE RESPECTIVE DES DEUX CHIMIOTYPES
DANS CHACUN DES SOUS-TYPES DU LYSOTYPE A
DE *Salmonella typhi*.

Le lysotype A de *Salmonella typhi* est cosmopolite. C'est aussi l'un de ceux que l'on rencontre le plus fréquemment en Europe, en Afrique, surtout en Afrique Noire, à Madagascar et en Amérique. En Asie, il est moins commun sans être jamais très rare.

On comprend aisément que cette trop grande fréquence est assez fâcheuse pour l'efficacité de la méthode lysotypique : plus un lysotype est banal dans une région considérée, plus faible est son intérêt lors des enquêtes épidémiologiques.

Afin de remédier à cet inconvénient, nous avons entrepris d'essayer de subdiviser le lysotype A.

(3) La lysotypie du bacille typhique par la méthode de Craigie et Felix consiste à éprouver, sur plaques de gélose, des souches de cette espèce par des préparations adaptées du bactériophage Vi II. Chaque préparation adaptée est en quelque sorte spécifique du lysotype qui a permis son adaptation. La méthode donne la possibilité d'identifier avec la plus grande précision près de 70 variétés (lysotypes) bien différentes de bacille typhique, dont certaines sont cosmopolites et d'autres sont localisées en des régions relativement limitées du globe. La lysotypie présente un grand intérêt pour l'étude des épidémies de fièvre typhoïde.

Une première subdivision s'offrait à nous, c'était celle que fournit la méthode de Kristensen. Le lysotype A est, nous l'avons vu, hétérogène dans ses propriétés fermentatives à l'égard du xylose : sur 2 423 souches de ce lysotype que nous avons identifiées au Centre Français de la Lysotypie Entérique, 1 349 attaquaient ce sucre et 1 074 le laissaient intact, ce qui représente 55,67 p. 100 de souches xylose positives et 44, 32 p. 100 de souches xylose négatives.

Dans une autre série de 4 736 souches du lysotype A qui nous avaient été envoyées par divers centres de lysotypie, nous avons trouvé 2 874 souches xylose positives (60,68 p. 100) et 1 862 souches xylose négatives (39,31 p. 100).

Malgré l'intérêt que présente la méthode biochimique appliquée au lysotype A, il faut bien reconnaître que la subdivision binaire qu'elle permet n'est pas suffisante pour les exigences de l'épidémiologie.

Desranleau [4] en 1947, a pu distinguer trois variétés parmi les cultures du lysotype A en utilisant, conjointement avec la lysotypie classique, un nouveau jeu de cinq bactériophages Vi non adaptés : les phages Vi I, III, IV, V et VI ; la variété commune du lysotype A est sensible aux cinq phages ; la variété A φ est insensible aux phages Vi I et V, la variété A ψ , aux phages Vi III et VI. Scholtens [22], enfin, a proposé une subdivision de certains lysotypes fréquents par l'emploi d'une série de phages Vi non adaptés (système d'Utrecht).

Deux d'entre nous (P. N. et G. D. [16]) avec Marie Pavlatou, ont pu, au moyen d'une lysotypie complémentaire comprenant 16 bactériophages extraits pour la plupart des souches lysogènes du lysotype A de *Salmonella typhi*, subdiviser ce lysotype en 9 sous-types qui, comme les lysotypes identifiés par la méthode de Craigie et Felix, sont stables *in vivo* et *in vitro*, et constants dans les foyers et, pour ces raisons, utiles en épidémiologie.

Certains de ces sous-types sont biochimiquement homogènes ou presque homogènes : sur 357 souches du sous-type Douala, 12 seulement appartenaient au chimiotype I (3,63 p. 100) et 345 au chimiotype II (96,63 p. 100). Sur 169 souches du sous-type Chamblee, 162 ont donné les réactions du chimiotype I (95,85 p. 100), tandis que 7 seulement donnaient celles du chimiotype II (4,14 p. 100). Sur 11 souches du sous-type Welshpool, 10 étaient xylose positives (chimiotype I : 90,90 p. 100) et une seulement du chimiotype II (9,09 p. 100). Sur 122 souches du sous-type Léopoldville, il y en avait 7 seulement du chimiotype I (5,73 p. 100) et 115 du chimiotype II (94,26 p. 100).

Les autres sous-types sont mixtes dans leurs propriétés biochimiques : ainsi pour le sous-type Montréal, on observe à peu près la même quantité des deux chimiotypes : 14 pour le chimio-

type 1 et 12 pour le chimiotype II. Pour le sous-type Tananarive, le plus fréquent des sous-types du lysotype A, il y a deux fois plus de souches xylose positives (2 099 soit 63,62 p. 100) que de souches négatives (1 200 soit 36,37 p. 100).

Le sous-type Oswestry compte 6 fois plus de souches du chimiotype I que de souches du chimiotype II (29 contre 5, soit 85,29 p. 100 contre 14,71 p. 100). Enfin, le sous-type Maracaibo mérite une mention spéciale. D'abord, il ne se rencontre que très exceptionnellement en Europe, en Afrique du Nord et en Extrême-Orient. On le trouve au contraire très abondamment et à l'exclusion à peu près totale des autres sous-types du lysotype A dans la région des Caraïbes. Il y est toujours du chimiotype I. Venezuela : 121 souches : Martinique et Guadeloupe : 79 souches : Guyane Française : 16 souches, Jamaïque : 15 souches, ainsi qu'en Afrique du Sud, au Cap : 37 souches.

La seule autre région du monde où il semble encore assez abondant, mais non exclusif, c'est le Sénégal et spécialement à Dakar : 77 souches du sous-type Maracaibo sur un total de 189 souches. Mais, chose curieuse, alors que partout ailleurs les souches de ce sous-type sont xylose-positives, à Dakar elles sont toutes xylose négatives.

Il serait tentant d'établir une relation entre la fréquence du sous-type Maracaibo dans la région des Caraïbes et, de l'autre côté de l'Atlantique, sur le même parallèle, à Dakar. On pourrait y voir soit un argument supplémentaire en faveur d'un continent effondré (l'Atlantide) et dont les bords présentent la même flore et la même faune, soit une conséquence du trafic des négriers qui transportèrent, d'Afrique vers les Isles, des noirs par tribus entières avec leurs fétiches, leurs maladies et leurs parasites, soit une conséquence des relations maritimes intenses entre ces parties de deux continents. Mais comment expliquer qu'en traversant l'Atlantique, soit d'Ouest en Est, soit d'Est en Ouest, le sous-type Maracaibo ait changé de chimiotype ? Ne faut-il pas voir dans cette transformation l'influence d'un facteur écologique (ethnique, alimentaire, etc.) ?

FRÉQUENCE RESPECTIVE DES DEUX CHIMIOTYPES PARMI DES SOUCHES APPARTENANT AUX SOUS-GROUPES DU GROUPE I + IV DE *S. typhi*.

Un certain nombre de souches de *S. typhi*, bien que suffisamment riches en antigène Vi (4) ne peuvent pas être lysotypées parce qu'elles sont totalement insensibles aux diverses prépara-

(4) Rappelons que le phage Vi II dont les préparations adaptées sont utilisées pour la lysotypie du bacille typhique, ne peut agir que sur des bacilles possédant l'antigène Vi. Ce facteur est le récepteur des phages Vi.

tions adaptées du phage Vi II, actuellement en usage. Elles sont cependant sensibles à d'autres phages Vi, notamment au phage Vi I ou au phage Vi IV ou aux deux. Nous classons de telles souches non lysotypables dans un groupe provisoire, le groupe I + IV qui, en pratique épidémiologique, présente le même intérêt qu'un lysotype véritable.

Ce groupe I + IV est cosmopolite, mais il est relativement fréquent dans certains pays ou certaines régions du globe, en particulier en Iran et en Extrême-Orient (Saïgon).

Nous avons entrepris de le subdiviser par une lysotypie complémentaire en utilisant des bactériophages extraits des souches lysogènes du même groupe (Nicolle et Diverneau [13]). Treize sous-groupes ont pu être individualisés ainsi. Certains d'entre eux sont homogènes ou presque homogènes du point de vue biochimique. La plupart font fermenter le xylose (chimiotype I) ; ce sont les sous-groupes 2, 5, 9, 11, 13, tous provenant presque exclusivement d'Extrême-Orient, et les sous-groupes 3 et 7, provenant d'Iran. Un autre sous-groupe, également biochimiquement homogène, ne décompose pas le xylose (chimiotype II) ; c'est le sous-groupe 8, formé de souches européennes.

Enfin, quelques sous-groupes sont chimiotypiquement mixtes : les pourcentages des chimiotypes I et II de chacun de ces sous-types mixtes ont été pour le sous-groupe 1 (Extrême-Orient), de 80,26 et 19,73 ; pour le sous-groupe 4 (Europe Centrale), de 71,42 et 28,57 ; pour le sous-groupe 10 (Iran), de 44,00 et 56,00 ; pour le sous-groupe 12 (Afrique du Nord), de 20,00 et de 80,00. Dans un dernier sous-groupe, comprenant les souches non identifiables par cette lysotypie complémentaire, on a compté 66,66 p. 100 de souches xylose-positives (chimiotype I) et 33,33 p. 100 de souches xylose-négatives (chimiotype II).

ACTION COMPARÉE DES BACILLES TYPHIQUES SUR LES ANTIPODES OPTIQUES DU XYLOSE (5).

Rappelons que le D(+) xylose ou sucre de bois existe, sous la forme condensée de xylanes, dans de nombreux végétaux. Il a été isolé et identifié pour la première fois par Koch [7] (fig. 1).

Son inverse optique, le L(−) xylose (fig. 2) n'a jamais encore été rencontré dans la nature. Il a été préparé pour la première fois par Fischer et Ruff [5] par dégradation de l'acide L(−) gulonique au moyen de l'eau oxygénée en présence d'acétate ferrique.

J. Nicolle et Y. Joyeux [14] ont montré que l'antipode naturel du xylose était une bonne source de carbone pour un grand nombre de bactéries cultivées en milieu synthétique. Dans des conditions

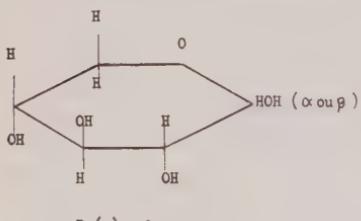
(5) Produits de la maison Hoffmann-Laroche, Paris.

semblables, les mêmes germes se sont au contraire montrés incapables d'utiliser l'antipode non naturel.

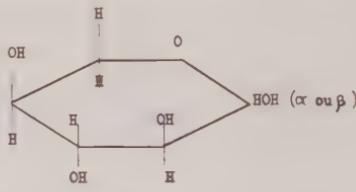
Nous avons repris systématiquement l'étude des propriétés fermentaires des deux xyloses en utilisant un grand nombre de souches *S. typhi*.

Dans une première série d'expériences, nous avons effectué des cultures, selon la méthode classique de Kristensen, en eau peptonée additionnée soit de l'un, soit de l'autre des antipodes du xylose, en présence de bleu de bromothymol.

Sur un total de 892 souches de provenance très variée et appartenant à de nombreux lysotypes (A, B2, C1, C2, C3, C4, C9, D1 D2, D4, E1, E9, F1, G, J1, L2, M1, M2, N, T, 25, 37, 38, 40, 42 et 43, ainsi qu'aux groupes des souches non lysotypables : groupe



D (+) xylose



L (-) xylose

FIG. 1.

FIG. 2

I + IV, groupe des souches aliénosensibles, groupe Vi-négatif), 695 souches ont fait fermenter le xylose naturel et 197 ne l'ont pas attaqué.

Aucune des 892 souches n'a exercé la moindre action sur le xylose non naturel.

Dans un deuxième groupe d'expériences les cultures ont été faites en milieu synthétique (formule de A. Lwoff, F. Nitti et M^{me} Tréfouël) additionné soit de l'un, soit de l'autre des isomères du xylose, de bleu de bromothymol et d'une quantité minimale de peptone fournissant les facteurs de croissance indispensables au développement des bactéries typhiques en milieu synthétique. Cette quantité minimale était contenue dans la goutte de culture de bactérie typhique en eau peptonée utilisée pour l'ensemencement d'un tube contenant un centimètre cube de milieu synthétique.

Toutes les souches essayées, au nombre de 65, qui avaient été choisies parce qu'elles étaient xylose-positives, ont donné dans les tubes contenant le D(+) xylose en vingt-quatre heures une culture appréciable et un virage au jaune de l'indicateur coloré.

Les tubes de milieu contenant le L(—) xylose n'ont montré qu'un très faible développement du bacille typhique, développement dû à la petite quantité de peptone introduite lors de l'ensemencement, mais dans aucun cas le virage au jaune ne s'est produit, même après plusieurs jours.

De ces deux séries d'expériences, on peut donc conclure que les bacilles typhiques qui utilisent le D (+) xylose sont incapables de décomposer l'antipode non naturel. L'orientation spatiale de cet isomère semble ne pas trouver de correspondance dans l'équipement enzymatique des bacilles étudiés.

CONCLUSIONS.

Sur un total de 9 453 souches de *Salmonella typhi* provenant de quatre continents (Europe, Afrique, Asie et Amérique), les proportions de souches utilisant le D(+) xylose (chimiotype I de Kristensen) et de souches incapables de l'utiliser (chimiotype II) ont été respectivement de 72,99 p. 100 et 27,00 p. 100. Mais ces pourcentages varient parfois assez considérablement selon les régions géographiques considérées : le chimiotype I est très abondant au Vietnam et au Cambodge (80,52 p. 100), en France (78,55 p. 100) et dans les autres pays d'Europe (78,93 p. 100), en Afrique du Nord (76,53 p. 100), en Amérique (76,54 p. 100). Sa fréquence est encore assez grande à Madagascar (67,68 p. 100), en Turquie et en Iran (66,66 p. 100), au Congo, Léopoldville (62,70 p. 100). Elle est nettement moindre au Sénégal (54,17 p. 100).

Certains lysotypes (méthode de Craigie et Felix), certains sous-types du lysotype A (méthode de Nicolle, Pavlatou et Diverneau) ou certains sous-groupes du groupe I + IV (groupe des souches Vi positives insensibles à toutes les préparations adaptées du phage Vi II actuellement en usage) (méthode de Nicolle et Diverneau) sont biochimiquement homogènes. D'autres lysotypes, sous-types ou sous-groupes au contraire sont mixtes. Pour les premiers, la méthode biochimique ne peut apporter qu'une confirmation, souvent utile, des données fournies par les lysotypies. Pour les seconds, elle permet une subdivision, toujours très précieuse pour l'épidémiologie.

De nombreux essais ont été faits, dans lesquels le L(—) xylose avait été substitué au D(+) xylose. Dans aucun cas, l'utilisation de l'antipode optique du xylose naturel n'a été observée.

On peut en conclure que : a) l'enzyme ou la série d'enzymes mises en jeu dans la décomposition du D(+) xylose sont sans action sur le L(—) xylose ; b) les bacilles typhiques n'élaborent pas l'enzyme ou la série d'enzymes qui conviendraient à l'utilisation du L(—) xylose.

SUMMARY

STUDIES ON THE FERMENTATIVE COMPORTMENT OF TYPHOID BACILLI
TOWARDS NATURAL D(+) XYLOSE AND ITS OPTICAL INVERSE
L(--) XYLOSE.

Among 9 453 *Salmonella typhi* strains isolated in four continents (Europe, Africa, Asia, America), the percentage of strains attacking D(+) xylose (Kristensen's chemotype I) was 72,99 %, that of strains unable to attack it (chemotype II), 27 %. But this percentage sometimes varies rather markedly according to geographical regions. Chemotype I is very abundant in Vietnam and Cambodge (80,52 %), in France, (78,55 %) and in the other European countries (78,93 %), in North Africa (76,52 %), in America (76,54 %). It is still rather frequent in Madagascar (67,68 %), in Turkey and Iran (66,66 %), in Congo, Leopoldville (62,70 %); it is markedly less frequent in Senegal (54,17 %).

Certain Vi-phage types (Craigie and Felix' method), certain sub-types of the phage-type A (Nicolle, Pavlatou and Diverneau's method), or certain sub-groups of the group I + IV (group of Vi-positive strains unsensitive to all the adapted Vi II phage preparations in use to-day [Nicolle and Diverneau's method]) are biochemically homogeneous. On the contrary, other Vi-phage-types, sub-types or sub-groups are mixed. For the former, the biochemical method can give only a confirmation (often useful) of the data yielded by the phage-typing. For the latter, it allows a subdivision, very valuable in epidemiology.

Many experiments were carried out using L(--) xylose instead of D(+) xylose. It never was possible to demonstrate an attack of L(--) xylose.

The following conclusion may therefore be drawn : a) the enzyme (or the series of enzymes) attacking D(+) xylose is deprived of any activity on L(--) xylose ; b) typhoid bacilli do not produce the enzyme (or the series of enzymes) which would be able to attack L(--) xylose.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] BLASI (R. de) et BUOGO (H.). *Riv. Ital. Ig.*, 1952, **42**, 15.
- [2] BRANDIS (H.) und MAURER (H.). *Z. Hyg.*, 1954, **140**, 138.
- [3] CHOMICZEWSKI (J.). *Med. Dosw. Mikrob.*, 1960, **12**, 195.
- [4] DESRANLEAU (J.-M.). *Canad. J. publ. Hlth.*, 1947, **38**, 343.
- [5] FISCHER (E.) et RUFF (O.). *Ber.*, 1900, **32**, 2142.
- [6] JUDE (A.) et NICOLLE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 550.
- [7] KOCH (F.). *Ber.*, 1887, **20** (R. III), 145.

- [8] KRISTENSEN (M.) et HENRIKSEN (H. C.). *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1926, **3**, 551.
- [9] KRISTENSEN (M.). *J. Hyg.*, 1958, **38**, 688.
- [10] LACHOWICZ (K.) et BUCZOWSKI (Z.). *Med. Dosw. Mikrob.*, 1950, **2**, 390.
- [11] NICOLLE (J.) et JOYEUX (Y.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 1390.
- [12] NICOLLE (P.). *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1957, **2**, 929.
- [13] NICOLLE (P.) et DIVERNEAU (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **249**, 1968.
- [14] NICOLLE (P.) et DIVERNEAU (G.). *Zbl. Bakt. I. Ref.*, 1961, **178**, 73.
- [15] NICOLLE (P.), DIVERNEAU (G.), BRAULT (J.) et DU PLESSIS (A. M.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1960, **53**, 965.
- [16] NICOLLE (P.), PAVLATOU (M.) et DIVERNEAU (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 2453.
- [17] NICOLLE (P.), DIVERNEAU (G.) and BRAULT (J.). *Bull. Res. Coun. Israel*, 1958, **7 E**, 89.
- [18] NICOLLE (P.), VAN OYE (E.), CROCKER (C. G.) et BRAULT (J.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1955, **48**, 492.
- [19] OLITZKI (A. L.), SHELUBSKY (M.) et STRAUSS (W.). *Harefuah*, Tel Aviv, 1948, 107.
- [20] OLITZKI (A. L.) et SHELUBSKY (M.). *The Res. Council Israel*, Jérusalem, 1944.
- [21] PAVLATOU (M.) et NICOLLE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 185.
- [22] SCHOLTENS (R. Th.). *Ant. v. Leeuwenhoek*, 1950, **16**, 245.
- [23] SPANO (C.). *Riv. Ist. sieroter. it.*, 1956, **31**, 104.

MODE DE PROPAGATION DES BACILLES DYSSENTÉRIQUES

I. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE CHEZ LE COBAYE AVEC SHIGELLA SONNEI (*)

par Szymona SZTURM-RUBINSTEN et Danielle PIÉCHAUD.

(C. N. R. S. et Institut Pasteur, Service de Microbie générale)

INTRODUCTION.

L'inoculation des bacilles dysentériques par voie nasale nous a montré (Piéchaud et Szturm-Rubinsten [2]) que ces germes sont capables de survivre dans l'organisme du cobaye sans donner lieu à aucune manifestation clinique. C'est dans le pharynx que la persistance du germe est la plus frappante. Nous avons recherché la présence du bacille dysentérique dans la gorge des cobayes infectés par voies oculaire et péritonéale. Nous l'avons isolé de la gorge quand il était présent dans l'œil et, dans certains cas, quand le prélèvement oculaire était devenu négatif.

Chez les cobayes infectés par voie intrapéritonéale, on peut retrouver également le germe dans la gorge.

Le travail que nous rapportons ici a été entrepris pour rechercher quelle est la voie qu'utilise le germe pour se propager, et il nous a paru que deux hypothèses seulement étaient à retenir : voie sanguine ou voie lymphatique. En effet, la propagation par les voies aériennes ne rendait compte que de l'extension du germe inoculé par voie oculaire ou nasale.

1^o Inoculation des cobayes par voie intrapéritonéale. — Cinq cobayes sont infectés par voie intrapéritonéale avec une souche virulente de *Sh. flexneri* 2 (Dakar 863) : on injecte 0,5 ml d'une culture jeune (vingt-quatre heures) en bouillon (tableau I).

Deux cobayes sont morts le lendemain ; le germe est retrouvé par hémoculture et dans les ganglions suivants : inguinaux,iliaques, trachéaux, mésentériques et maxillaires. Les autres cobayes sont sacrifiés quarante-huit heures, trois et six jours

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 13 avril 1961.

après l'inoculation. Les hémocultures et les adénocultures sont stériles chez les cobayes sacrifiés quarante-huit heures et six jours après l'inoculation.

Celui sacrifié trois jours après l'injection avait une hémoculture et la plupart des adénocultures négatives, mais d'un ganglion

TABLEAU I. — Inoculation par voie intrapéritonéale.

SH. FLEXNERI 2 DAKAR 863	HÉMOCULTURE	GANGLIONS				
		inguinaux	iliaques	mésentériques péri-portaux	axillaires	trachéo- maxillaires
COBAYE 1 mort en 24 h	+++	+	++	++	—	+
COBAYE 2 mort en 24 h	+	+	—	—	—	+++
COBAYE 3 sacrifié 48 h après l'injection	—	—	—	—	—	—
COBAYE 4 sacrifié 3 jours après l'injection	—	—	—	+	—	—
COBAYE 5 sacrifié 6 jours après l'injection	—	—	—	—	—	—

+++ = très nombreuses colonies
 ++ = > 10 colonies
 + = de 1 à 10 colonies
 — = pas de culture

mésentérique nous avons isolé, à côté de plusieurs colonies d'*E. coli*, une colonie suspecte, identifiée comme étant *Sh. flexneri* 2.

Quatorze cobayes, inoculés par voie intrapéritonéale également avec 0,5 ml d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures d'une souche de *Shigella sonnei* en phase I, succombent à l'infection ou sont sacrifiés le lendemain. Huit hémocultures sur 9 pratiquées

sont positives. Tous les prélèvements de ganglions ont permis d'isoler le germe.

2^e *Inoculation des cobayes par voie intradermique.* — La voie intrapéritonéale étant assez brutale (les souches virulentes tuaient souvent les cobayes en vingt-quatre heures), nous avons essayé la voie intradermique. Elle s'est avérée très intéressante pour l'étude du mode de propagation des bacilles dysentériques dans l'organisme.

Nous avons travaillé d'abord avec une culture non diluée en bouillon de vingt-quatre heures ; 0,15 ml d'une souche de *Sh. sonnei* en phase I (Saigon 60120) est injecté à six cobayes. Les animaux sont sacrifiés six, vingt-quatre, quarante-huit heures, trois, quatre, six jours après l'inoculation (lieu d'inoculation : le flanc droit aux deux tiers de la longueur de l'animal).

L'hémoculture est pratiquée sur gélose SS et en bouillon. Nous avonsensemencé environ 1 ml de sang dans 10 ml de bouillon et quelques gouttes sur une boîte de gélose SS.

Les ganglions sont prélevés stérilement, incisés en plusieurs endroits, et la pulpe ainsi écrasée est traînée à l'aide d'une pince à la surface de la gélose SS (tableau II).

Les lésions sont insignifiantes chez le cobaye sacrifié six heures après l'inoculation ; l'hémoculture est négative ; le germe est isolé à partir de plusieurs ganglions. La vitesse avec laquelle le germe avait envahi l'organisme nous a frappées. Vingt-quatre heures après l'inoculation les lésions sont très marquées. Lieu d'inoculation : à la palpation la peau est épaisse et infiltrée, sa face profonde présente une plaque longue de 7 cm, large de 4 cm, hémorragique ; à ce même niveau les muscles abdominaux sont couverts d'un œdème gélatineux.

Les ganglions sont volumineux, quelquefois durs. Le germe est retrouvé presque dans tous les ganglions, dans la rate et l'utérus. L'hémoculture est négative.

Le cobaye sacrifié quarante-huit heures après l'inoculation présente des lésions très importantes, un œdème hémorragique, gélatineux, un utérus congestionné. Cependant, toutes les cultures des ganglions et du sang sont négatives.

Les animaux sacrifiés trois et quatre jours après ont une hémoculture positive en bouillon (où on met davantage de sang), négative sur SS.

Nous insistons sur cette absence de culture sur le milieu SS parce que la différence de l'inoculum en bouillon et sur SS explique sans doute ce phénomène et prouve que le nombre de germes dans le sang est peu élevé. Il n'est d'ailleurs pas exceptionnel que le trouble en bouillon ait mis quarante-huit heures à paraître.

Ce qui frappe c'est que les animaux ne semblent pas être incommodés par la présence des germes dans le sang ; ils sont vifs et propres. A partir de plusieurs ganglions le germe a pu être isolé.

L'animal, sacrifié six jours après, ne présente pas de lésions marquées ; l'hémoculture et la culture des ganglions sont négatives.

Dans les mêmes conditions d'expérience nous avons inoculé une

TABLEAU II. — Voie intradermique.

SH. SONNEI phase 1 SAIGON 60 120	POINT D'INOCULATION	HÉMOCULTURE		GANGLIONS					
		SS	bouillon	inguinaux	iliaques	mésentériques péri-portaux	axillaires	trachéo- bronchiques	maxillaires
COBAYE 1 sacrifié 6 h après l'inoculat.	+	—	—	—	+	++	+++	+++	
COBAYE 2 sacrifié 24 h après l'inoculat.	+++	—	—	+++	++	+++	—	++	
COBAYE 3 sacrifié 48 h après l'inoculat.	++	—	—	—	—	—	—	—	
COBAYE 4 sacrifié 3 j après l'inoculat.	+++	—	+	+++	—	+++	—	+++	+++
COBAYE 5 sacrifié 4 j après l'inoculat.	+++	—	+	+	—	+++	—	+++	—
COBAYE 6 sacrifié 6 j après l'inoculat.	—	—	—	—	—	—	—	—	

— = pas de réaction ou pas de culture.
 + = légère infiltration ou 1 à 10 colonies.
 ++ = réaction marquée ou > 10 colonies.
 +++ = réaction cédémateuse ou purulente ou très nombreuses colonies, selon qu'il s'agit du point d'inoculation ou des cultures.

souche de bacille de Sonne en phase II (Ankara 775). Les cobayes ont été sacrifiés dans les mêmes délais ; la recherche des germes a été effectuée de la même façon dans les ganglions et dans le sang.

On n'observe aucune lésion au lieu d'inoculation ; la face pro-

TABLEAU III. — Voie intradermique.

SH. SONNEI phase II ANKARA 775	POINT D'INOCULATION	HÉMOCULTURE		GANGLIONS				
		SS	bouillon	inguinaux	iliaques	mésentériques péri-portaux	axillaires	trachéo- bronchiques
COBAYE 1 sacrifié 6 h après l'inoculat.	—	—	—	—	—	—	—	—
COBAYE 2 sacrifié 24 h après l'inoculat.	—	—	—	—	—	—	—	—
COBAYE 3 sacrifié 48 h après l'inoculat.	—	—	—	I colonie	—	—	—	—
COBAYE 4 sacrifié 3 j après l'inoculat.	—	—	—	—	—	—	—	—
COBAYE 5 sacrifié 4 j après l'inoculat.	—	—	—	—	—	—	—	—
COBAYE 6 sacrifié 6 j après l'inoculat.	—	—	—	—	—	—	—	—

fonde de la peau, les organes sont normaux. Toutes les hémo-cultures ont été négatives, les prélèvements de ganglions stériles (tableau III). Une seule fois, chez le cobaye sacrifié quatre-vingt heures après l'inoculation, une colonie suspecte fut isolée d'un ganglion inguinal et identifiée comme étant *Sh. sonnei* phase II, le germe inoculé.

Sh. sonnei en phase II, dépourvu de pouvoir pathogène, n'envahit pas l'organisme comme le germe en phase I virulent, qui exprime ainsi son pouvoir pathogène. Malgré la dose élevée, les souches dépourvues de virulence, comme *Sh. sonnei* en phase II, sont incapables de provoquer une réaction dans l'organisme.

TABLEAU IV. — Voie intradermique, doses diverses.

SH. SONNEI phase I CONCENTRATION DU GERME	POINT D'INOCULATION	HÉMOCULTURE		GANGLIONS					
		SS	bouillon	inguinaux	iliaques	mésentériques péri-portaux	axillaires	trachéo- bronchiques	maxillaires
COBAYE 1 10^7	+++	—	+	+	+	++	+++	+	++
COBAYE 2 10^6	+++	—	+	+++		++	+	++	++
COBAYE 3 4×10^5	+++	—	+	+++		++	++	+	+
COBAYE 4 2×10^5	+	—	+	+++	+	+	++		—
COBAYE 5 10^5	+	—	—	+	—	—	—		—
COBAYE 6 10^4	—	—	—	—	—	—	—	—	—

3° Rôle de la dose injectée. — Nous avons cherché quelle quantité de germes d'une souche de *Sh. sonnei* en phase I est nécessaire pour obtenir l'envahissement de l'organisme.

Une série de cobayes a été infectée avec les quantités de germes suivantes : 10^7 , 10^6 , $4 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$, 10^5 et 10^4 (souche S. 60120).

Pour les quatre premières doses le germe est retrouvé par hémoculture et dans les ganglions lymphatiques suivants : inguinaux, mésentériques périportaux, trachéaux, iliaques, axillaires et maxillaires.

Pour la dose 10^5 , l'hémoculture était négative ; le germe a été isolé seulement d'un ganglion inguinal du côté inoculé et du point d'inoculation (face profonde du derme). Tous les cobayes ont été sacrifiés vingt-quatre heures après l'injection (tableau IV).

Avec la même dilution, 10^5 germes, six cobayes sont inoculés

TABLEAU V. — Recherches du temps d'envahissement.
voie intradermique. Dose infectante : 10^5 .

SH. SONNEI phase I COBAYES SACRIFIÉS	POINT D'INOCULATION	HÉMOCULTURE		GANGLIONS			
		SS	bouillon	inguinaux	mésentériques périportaux	axillaires	trachéo- bronchiques
COBAYE 1 2 h après l'inoculation	—	—	—	—	—	—	—
Deux COBAYES 2 4 h après l'inoculation	—	—	—	—	—	—	—
COBAYE 3 24 h après l'inoculation	+	Typhi murium	+++ Sonne		Typhi murium		
COBAYE 4 48 h après l'inoculation	+	—	—	—	—	—	—
COBAYE 5 3 j après l'inoculation	+	—	—	—	—	—	—

avec une souche de *Sh. sonnei* phase I Dakar 16777 ; les animaux sont sacrifiés deux, quatre, vingt-quatre heures et deux et trois jours après. L'hémoculture et les adénocultures étaient stériles pour le premier, et pour un des deux cobayes sacrifiés après quatre heures. L'hémoculture du deuxième était stérile, mais le germe a été retrouvé dans les ganglions inguinaux et trachéaux. La réaction locale était insignifiante.

Le cobaye sacrifié vingt-quatre heures après l'injection avait

une lésion locale assez marquée, une infiltration de la peau et un œdème sous-cutané gélatineux dans la paroi abdominale de cette région. Malheureusement, le cobaye était infecté par une *Salmonella typhi murium* qui a été isolée par hémoculture et trouvée dans les ganglions mésentériques, trachéaux, thoraciques et sous-maxillaires.

Cependant, le germe injecté, *Sh. sonnei* en phase I, a été isolé des ganglions inguinaux et du point d'inoculation.

La réaction locale était peu marquée chez le cobaye sacrifié après quarante-huit heures. Un peu plus forte chez celui de trois jours, chez qui le germe a été isolé dans la région sous-cutanée sous-jacente au point d'inoculation. Les ganglions et les hémocultures sont restées stériles pour les deux cobayes (tableau V).

La même expérience avec une quantité quatre fois plus élevée ($4 \cdot 10^6$) de germes de la même souche nous a donné les résultats suivants :

Chez le cobaye sacrifié une heure après l'injection, l'hémoculture et presque toutes les adénocultures étaient positives.

Après deux heures : hémoculture négative, germe retrouvé dans les ganglions inguinaux et axillaires.

Après trois heures : hémoculture négative ; presque toutes les adénocultures positives.

Après quatre et six heures : hémoculture et cultures de nombreux ganglions positives (tableau VI).

Il nous semble donc que la transmission du germe se fait par voie lymphatique ; pour mettre ce phénomène en évidence, il faut choisir une dose telle qu'elle soit infectante, mais non suffisamment élevée pour forcer les défenses organiques et permettre le passage du germe dans le sang d'emblée. Il est certain que cette dose est variable selon la virulence de la souche.

Reilly et coll. [3] séparent le bacille typhique des germes entéro-tropes, tels le bacille dysentérique et le vibron cholérique. Le bacille typhique aurait une prédisposition pour les organes lymphoïdes ; les bacilles dysentériques et le vibron cholérique végèteraient sur la muqueuse digestive ou la paroi intestinale sans proliférer dans les relais ganglionnaires.

Cependant, Chantemesse et Widal [4], en 1888, retrouvent l'agent pathogène dans les ganglions mésentériques d'un malade atteint de dysenterie épidémique.

Dans nos expériences sur les cobayes, dans les conditions où nous nous sommes placées, et notamment en utilisant la voie intradermique, le germe se localise électivement dans le tractus ganglionnaire.

Nos expériences sont concluantes en ce qui concerne *Sh. sonnei* en phase I virulente et en phase II avirulente. Nous nous proposons de les reprendre avec d'autres *Shigella* de différents groupes.

TABLEAU VI. — Recherche du temps d'envenissement.
Voie intradermique. Dose infectante : 4×10^5 .

SH. SONNEI phase I COBAYES SACRIFIÉS	POINT D'INOCULATION	HÉMOCULTURE		GANGLIONS				
		SS	bouillon	inguinaux	mésentériques péri-portaux	axillaires	trachéo- bronchiques	maxillaires
COBAYE 1 1 h après l'inoculation	+	—	+	++	++	+++	—	+
COBAYE 2 2 h après l'inoculation	+	—	—	++	—	++	—	—
COBAYE 3 3 h après l'inoculation	++	—	—	+++	++	++	—	++
COBAYE 4 4 h après l'inoculation	+	+	+	++	—	—	—	++
COBAYE 5 6 h après l'inoculation	+	+	+	+++	+	—	+	+

RÉSUMÉ.

Etudiant la propagation de *Sh. sonnei* dans l'organisme du cobaye, d'abord par injection du germe dans le péritoine puis par voie intradermique, nous déterminons une dose infectante telle que le germe est retrouvé dans les ganglions lymphatiques, alors que le sang reste stérile.

Nous en concluons donc que la voie de propagation du germe est très vraisemblablement la voie lymphatique.

SUMMARY

MECHANISM OF THE PROPAGATION OF DYSENTERY BACILLI.

I. — EXPERIMENTAL STUDY IN GUINEA-PIGS INOCULATED WITH
Shigella sonnei.

The authors study the propagation of *S. sonnei* in guinea-pigs, first by means of intraperitoneal, then by intradermal injection.

They succeeded in determining the number of germs able to infect the animals but staying localized in the lymph node only, the blood stream remaining germ free.

These findings suggest that the propagation route of the micro-organisms is the lymphatic system.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHANTEMESSE et WIDAL (F.). *Bull. Acad. Méd.*, 1888, **19**, 522.
- [2] PIÉCHAUD (D.) et SZTURM-RUBINSTEN (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 511-517.
- [3] REILLY (J.), RIVALIER (E.), COMPAGNON (A.), LAPLANE (R.) et DU BUIT (H.). *Ann. méd.*, 1935, **37**, 354.

**DIFFÉRENCES DE TENEUR DES SOUCHES
DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN VARIANTES
RÉSISTANTS A LA STREPTOMYCINE
SELON LA VARIÉTÉ DE STREPTOMYCINE
ET LE MILIEU DE CULTURE EMPLOYÉS**

par J. GROSSET et G. CANETTI (*)

(Institut Pasteur, Service de la Tuberculose)

On sait de longue date que l'activité de la streptomycine sur le bacille tuberculeux varie notablement selon le milieu de culture. Ainsi, la concentration minima active de streptomycine est plus faible en milieu liquide de Dubos qu'en milieu de Youmans [7, 12], ce qui tient à la présence, dans le milieu de Dubos, du Tween 80, agent de dispersion des éléments bacillaires [7, 12]. D'autre part, on s'est aperçu dès les premiers temps de l'emploi des milieux à l'œuf pour les mesures de résistance que, dans certaines conditions (milieux exigeant une coagulation à 85°, streptomycine ajoutée *avant* coagulation), la concentration minima active de streptomycine est considérablement plus élevée en milieu à l'œuf qu'en milieu liquide (Youmans et coll. [13]). Cette constatation a eu pour conséquence pratique, soit l'emploi de milieux à l'œuf n'exigeant pas un chauffage à 85° (milieu de Herrold [8, 10]), soit l'addition de la streptomycine au milieu de Loewenstein-Jensen *après* coagulation seulement, selon la méthode de Coletsos et Boisvert [3, 4, 5], soit enfin, lorsque l'incorporation de la streptomycine dans le milieu de Loewenstein-Jensen avant coagulation était maintenue, l'emploi de quantités de streptomycine deux ou trois fois plus fortes que celles théoriquement nécessaires [6, 11 bis]. Une autre incertitude en cette matière résulte de certaines différences d'activité entre streptomycine et dihydrostreptomycine en milieu à l'œuf : d'après Bogen [1] cette dernière n'y montre pas de diminution d'activité, contrairement à la streptomycine.

(*) Manuscrit reçu le 20 mars 1961.

Le milieu de Loewenstein-Jensen est devenu à l'heure actuelle le milieu de choix pour les mesures de résistance bacillaire. D'autre part, la fabrication de ce milieu est considérablement simplifiée par l'incorporation de l'antibiotique *avant* la coagulation. Il a donc semblé utile d'apporter, à l'aide de la méthode de détermination quantitative des taux de variants résistants des souches sauvages, des précisions supplémentaires sur l'importance exacte de certains facteurs tels que le chauffage, la nature de la streptomycine employée, enfin le milieu de culture considéré en lui-même. C'est l'objet du présent travail.

A. — INFLUENCE DE LA STREPTOMYCINE EMPLOYÉE SUR LE TAUX DES VARIANTS RÉSISTANTS DES SOUCHES SAUVAGES.

La première expérience rapportée ici a pour but d'étudier comparativement l'action antibacillaire de la streptomycine et de la dihydrostreptomycine en milieu de Loewenstein-Jensen. En milieu liquide (milieu de Kirchner modifié au Tween 80), l'activité de ces deux agents est la même (Rake et coll. [1]).

TECHNIQUE. — On prépare simultanément des tubes de milieu de Loewenstein-Jensen contenant du sulfate de dihydrostreptomycine et des tubes contenant du sulfate de streptomycine. L'antibiotique est incorporé au milieu avant la coagulation ; les quantités ajoutées réalisent des concentrations de 1 µg, 2 µg, et 4 µg/ml respectivement. Tous les tubes sont ensuite soumis à la même coagulation (50 minutes à 85° C). Après un séjour de vingt-quatre heures à la température du laboratoire, les tubes sont capuchonnés et gardés au réfrigérateur à 4° C pendant trois ou quatre jours. Le nombre des variants résistants aux diverses concentrations de streptomycine et de dihydrostreptomycine est ensuite déterminé. La technique d'ensemencement est identique à celle qui a été employée antérieurement (Canetti et Grosset [2]) ; les tubes contenant de la dihydrostreptomycine et ceux contenant de la streptomycine sont ensemencés simultanément, et avec une semence identique. Huit souches sauvages de bacilles tuberculeux ont ainsi été titrées.

RÉSULTATS. — Le tableau I précise, aux vingt-sixième et quarantième jours, le nombre des variants résistants aux diverses concentrations de streptomycine et de dihydrostreptomycine contenus dans 10⁶ bacilles. On constate les faits suivants :

1^o Tout comme pour la dihydrostreptomycine, il y a d'une souche à l'autre, de grandes variations du nombre des variants résistants à la streptomycine. Les nombres varient également selon la date de lecture que l'on choisit.

2^o Pour les trois concentrations d'antibiotique étudiées, les variants résistants à la streptomycine sont, en règle générale, en

nombre beaucoup plus élevé que les variants résistants à la dihydrostreptomycine. Si l'on s'en tient aux chiffres médians, au vingt-sixième jour, les nombres de variants résistants à 1 µg/ml sont de 54 500 pour la dihydrostreptomycine et de 390 000 pour la streptomycine ; à 2 µg/ml, de 110 pour la dihydrostreptomycine et de 7 500 pour la streptomycine ; et à 4 µg/ml, de 2,5 pour la dihydrostreptomycine et de 5 pour la streptomycine. Au quarantième jour, les différences sont encore plus nettes. Les chiffres

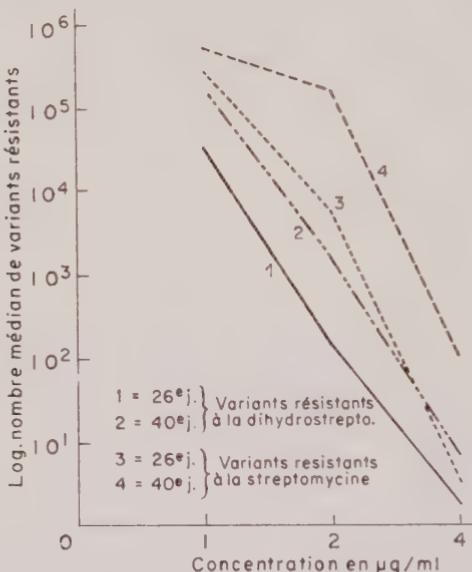


FIG. 1. — Nombre médian de variants résistants à 1, 2 et 4 µg/ml de dihydrostreptomycine et de streptomycine contenus dans 10^6 bacilles de 8 souches sauvages (milieu de Loewenstein-Jensen ; lecture au vingt-sixième et au quarantième jour).

respectifs sont, pour 1 µg/ml, de 200 000 et de 650 000 ; pour 2 µg/ml, de 1 185 et de 27 000, et pour 4 µg/ml de 7 et de 65 (fig. 1.).

Ainsi, il n'est pas indifférent de titrer une souche de bacilles tuberculeux sur des tubes de milieu de Loewenstein-Jensen contenant du sulfate de streptomycine ou sur des tubes de même milieu contenant du sulfate de dihydrostreptomycine. Ce dernier sel, incorporé au milieu de Loewenstein-Jensen avant coagulation, a une activité antibactérienne nettement supérieure.

Un point particulier mérite d'être souligné, car il est d'une grande importance pratique. Dans 10^6 bacilles d'une souche sau-

TABLEAU I. — Nombre de variants résistants à la dihydrostreptomycine et à la streptomycine contenus dans 10^6 bacilles de 8 souches sauvages de bactilles tuberculeux (milieu de Löwenstein-Jensen, coagulation de cinquante minutes à 85° C., antibiotiques incorporés avant la coagulation).

SOUCHE	DATE DE LECTURE	DIHYDROSTREPTOMYCINE (en µg/ml de milieu)			STREPTOMYCINE (en µg/ml de milieu)		
		1	2	4	1	2	4
407	26 ^e jour.....	1 250	3	< 1	700 000	5 000	1
	40 ^e jour.....	15 000	670	0,7	1 000 000	400 000	2
410	26 ^e jour.....	120 000	6	2	400 000	> 1 000	2
	40 ^e jour.....	200 000	240	2	500 000	50 000	2
411	26 ^e jour.....	6 000	4	3	> 100 000	> 100	6
	40 ^e jour.....	50 000	100	4	240 000	32 000	29
412	26 ^e jour.....	500 000	> 10 000	2	1 000 000	200 000	8
	40 ^e jour.....	600 000	40 000	10	1 000 000	700 000	3 850
413	26 ^e jour.....	125 000	140	3	300 000	> 10 000	4
	40 ^e jour.....	330 000	1 700	48	700 000	140 000	7 000
414	26 ^e jour.....	200 000	> 400	9	460 000	350 000	> 100
	40 ^e jour.....	200 000	10 000	28	540 000	470 000	> 100
415	26 ^e jour.....	11 000	450	3	380 000	46 000	> 100
	40 ^e jour.....	300 000	6 000	15	610 000	470 000	2 500
H37Rv	26 ^e jour.....	10 000	80	0,2	350 000	> 1 000	4
	40 ^e jour.....	25 000	200	2	740 000	100 000	22
Nombre médian	26 ^e jour.....	54 500	110	2,5	390 000	7 500	5
	40 ^e jour.....	280 000	1 185	7	650 000	270 000	> 65

vage, le nombre de bacilles résistants à 4 µg/ml de *dihydrostreptomycine* est toujours faible, que la lecture soit faite au vingt-sixième jour ou au quarantième jour, et les variations observées d'une souche à l'autre sont très limitées. Cette concentration pourrait donc être utilement choisie comme *concentration-critique* pour le critère de streptomycino-résistance (Canetti et Grosset [2]) : une souche normalement sensible à la streptomycine contient moins d'un bacille résistant à cette concentration sur 10⁴ bacilles.

Il n'en est pas de même pour 4 µg/ml de *streptomycine*. Dans 10⁶ bacilles d'une souche sauvage, le nombre de bacilles résistants à cette concentration est très variable. Il peut, au vingt-sixième jour, être supérieur à 100 bacilles et atteindre 7 000 au quarantième jour. Ainsi, la concentration de 4 µg/ml n'est pas une concentration-critique utilisable en toute sécurité, si l'on se sert de streptomycine et non de dihydrostreptomycine.

Les diverses expériences qui vont maintenant être exposées tentent de préciser les facteurs responsables de la supériorité d'action de la dihydrostreptomycine en milieu de Loewenstein-Jensen.

B. — INFLUENCE DE LA DURÉE DE LA COAGULATION DU MILIEU DE LOEWENSTEIN-JENSEN SUR LE TAUX DES VARIANTES RÉSISTANTS.

Les variations de durée de la coagulation ont souvent été considérées comme occupant une place de premier plan parmi les facteurs qui influencent les concentrations d'antibiotique actif dans le milieu de Loewenstein-Jensen. L'expérience qui suit est destinée à préciser l'influence que peuvent avoir des durées de coagulation différentes. L'étude porte sur trois temps de coagulation : une heure, deux heures et trois heures.

TECHNIQUE. — On prépare un certain nombre de tubes de milieu de Loewenstein-Jensen contenant de la dihydrostreptomycine, et un nombre identique de tubes de ce milieu contenant de la streptomycine, aux concentrations suivantes : 1 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg, et 20 µg/ml de milieu. Les différents tubes sont divisés en 3 lots égaux. Le premier est soumis à une coagulation d'une heure, le second à une coagulation de deux heures et le troisième à une coagulation de trois heures.

Des tubes de milieu de Loewenstein-Jensen sans antibiotique, coagulés pendant les mêmes durées, servent de tubes témoins. Après coagulation, tous les tubes sont gardés vingt-quatre heures à la température du laboratoire, puis placés au réfrigérateur à 4° C pendant huit jours. Les tubes sont ensuite ensemencés avec diverses dilutions d'une souche sauvage de bacilles tuberculeux, provenant d'une culture en milieu de Dubos, au Tween 80, âgée de 8 jours. La lecture est faite après vingt-quatre et trente-neuf jours d'étauve à 37° C.

RÉSULTATS. — Le tableau II précise, pour 10^6 bacilles, le nombre de variants résistants aux diverses concentrations de chaque antibiotique selon la durée de la coagulation et la date de lecture de l'ensemencement.

1^o Milieux à la dihydrostreptomycine. — Au vingt-quatrième jour, on ne note pas de différences appréciables entre les milieux coagulés une heure et ceux coagulés deux heures. Par contre, lorsque la durée de coagulation est de trois heures, les taux de variants résistants sont un peu plus élevés : on note dix fois plus de variants résistants sur les tubes contenant 1 µg/ml de dihydrostreptomycine et six fois plus de variants résistants sur les tubes contenant 2 µg/ml.

Au trente-neuvième jour, les différences constatées au ving-quatrième jour tendent à s'effacer. Il y a un peu plus de variants résistants sur les tubes contenant 1 µg/ml de dihydrostreptomycine et chauffés trois heures. Mais les taux de variants résistants sont les mêmes, quelle que soit la durée de coagulation, sur les tubes contenant 2 µg/ml de dihydrostreptomycine.

TABLEAU II. — Nombre de variants résistants à la dihydrostreptomycine et à la streptomycine contenus dans 10^6 bacilles d'une souche sauvage de bacilles tuberculeux selon la durée de coagulation du milieu (milieu de Læwenstein-Jensen, antibiotiques ajoutés avant la coagulation, coagulation à 85° C).

DURÉE DE LA COAGULATION	DATE DE LECTURE	DIHYDROSTREPTOMYCINE (en µg/ml de milieu)						STREPTOMYCINE (en µg/ml de milieu)								
		1	2	5	10	20	1	2	5	10	20	1	2	5	10	20
1 heure	24 ^e jour	1 000	3	< 1	0	0	580 000	4 000	1	0	0	0	0	0	0	0
	39 ^e jour	14 000	1 000	1	0	0	1 000 000	330 000	2	0	0	0	0	0	0	0
2 heures	24 ^e jour	3 000	3	0	0	0	350 000	7 700	1	0	0	0	0	0	0	0
	39 ^e jour	14 000	1 000	1	0	0	460 000	300 000	38	0	0	0	0	0	0	0
3 heures	24 ^e jour	20 000	18	0	0	0	1 000 000	?	6	0	0	0	0	0	0	0
	39 ^e jour	66 000	700	2	< 1	0	1 000 000	230 000	760	0	0	0	0	0	0	0

2^o Milieux à la streptomycine. — Au vingt-quatrième jour, la durée de la coagulation n'a que très peu d'influence sur le taux des variants résistants sélectionnés. Tout au plus peut-on constater une légère tendance à l'augmentation du taux des résistants lorsque la durée de la coagulation passe d'une heure à trois heures.

Au trente-neuvième jour, l'influence de la durée de la coagulation reste nulle pour les concentrations 1 µg et 2 µg de strepto-

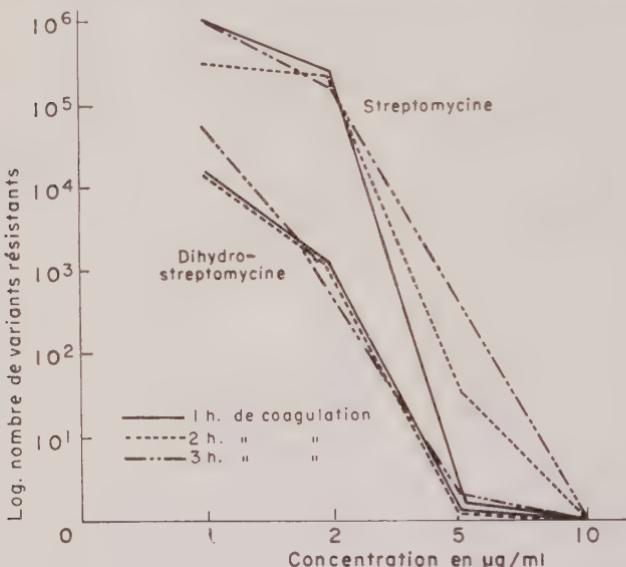


FIG. 2. — Nombre de variants résistants à la dihydrostreptomycine et à la streptomycine contenus dans 10⁶ bacilles d'une souche sauvage selon la durée de coagulation du milieu (milieu de Loewenstein-Jensen, lecture au trente-neuvième jour).

mycine. Par contre, elle est nette pour 5 µg. Il y a vingt fois plus de variants résistants sur les tubes coagulés deux heures et trois cents fois plus de variants résistants sur les tubes coagulés trois heures que sur les tubes coagulés une heure (fig. 2).

Au total, les faits suivants se dégagent :

a) Quelle que soit la durée de coagulation considérée, le phénomène le plus remarquable, déjà décrit plus haut, est la présence d'un nombre de variants plus élevé sur les milieux à la streptomycine que sur ceux à la dihydrostreptomycine.

b) L'allongement de la durée de la coagulation n'aboutit à une augmentation *considérable* du nombre des variants résistants ni pour la dihydrostreptomycine, ni pour la streptomycine.

c) Enfin, dans la mesure où l'augmentation de la durée de la coagulation exerce une influence, cette influence est plus prononcée pour la streptomycine que pour la dihydrostreptomycine.

On peut donc considérer que *la prolongation de la durée de la coagulation « inactive » très légèrement la streptomycine et est pratiquement sans action sur la dihydrostreptomycine.*

C. — TAUX DES VARIANTS RÉSISTANTS SELON QUE LA STREPTOMYCINE ET LA DIHYDROSTREPTOMYCINE SONT AJOUTÉES AU MILIEU DE LOEWENSTEIN-JENSEN AVANT OU APRÈS COAGULATION.

Afin de serrer de plus près encore l'incidence du chauffage à 85°, l'activité de la dihydrostreptomycine et celle de la streptomycine ont été étudiées comparativement selon que ces deux variétés d'antibiotiques sont ajoutées au milieu de Lœwenstein-Jensen avant ou après coagulation. Le dispositif expérimental suivant a été réalisé.

TECHNIQUE. — On prépare des tubes de Lœwenstein-Jensen contenant 1, 2, 4 et 10 µg/ml de dihydrostreptomycine et des tubes contenant 2, 4 et 10 µg/ml de streptomycine, les antibiotiques étant incorporés au milieu avant la coagulation. On prépare simultanément, avec le même lot de milieu de Lœwenstein-Jensen, un nombre égal de tubes sans antibiotiques. Ces derniers tubes sont placés, après coagulation, à l'étuve pendant douze heures pour obtenir l'évaporation de l'eau de condensation. On y porte ensuite, sous le volume de 0,2 ml des solutions de streptomycine et de dihydrostreptomycine variables. Ces solutions sont préparées de telle sorte que la quantité d'antibiotique, ajoutée au milieu sous le volume de 0,2 ml, y réalise des concentrations identiques à celles des tubes ayant reçu l'antibiotique avant la coagulation (1). Les tubes sont ensuite replacés à l'étuve durant vingt-quatre heures pour obtenir l'évaporation complète des solutions de streptomycine et de dihydrostreptomycine. On place également à l'étuve, en même temps, les tubes où la streptomycine et la dihydrostreptomycine ont été incorporées au milieu avant la coagulation, afin que l'éventuelle destruction de l'antibiotique due à ce séjour de vingt-quatre heures à l'étuve soit identique dans tous les systèmes préparés.

Après trois jours au réfrigérateur à 4° C, tous les tubes sont ensemençés, comme dans les expériences précédentes, avec diverses dilutions d'une souche sauvage de bacilles tuberculeux. Trois souches sauvages ont ainsi été testées, la première isolément, les deux autres simultanément sur un même lot de milieu.

(1) Les tubes de Lœwenstein-Jensen employés contiennent 7 ml de milieu. Pour préparer, par exemple, des tubes contenant 2 µg de streptomycine par ml de milieu, on répartit à la surface du milieu 0,2 ml d'une solution en eau bidistillée de streptomycine à 70 µg/ml.

TABLEAU III. — Nombre de variants résistants à la dihydrostreptomycine et à la streptomycine contenus dans 10⁶ bacilles de 3 souches sauvages selon que l'antibiotique a été ajouté avant ou après la coagulation.

RÉSULTATS. — Le tableau III précise pour les trois souches testées le taux de variants résistants aux diverses concentrations de dihydrostreptomycine et de streptomycine. Un certain nombre de faits apparaissent nettement :

1^o *Milieux à la dihydrostreptomycine.* — On ne distingue aucune différence majeure dans l'action de la dihydrostreptomycine selon qu'elle a été incorporée au milieu avant ou après coagulation. Il y a peut-être pour 1 µg et 2 µg/ml des taux de variants légèrement plus élevés lorsque la dihydrostreptomycine a été ajoutée après coagulation, mais pour 4 µg les résultats sont identiques. Il semble donc que la coagulation du milieu à 85° n'exerce qu'une très faible influence sur l'activité antibactérienne de la dihydrostreptomycine.

2^o *Milieux à la streptomycine.* — Il existe, au contraire, de très importantes différences dans l'action de la streptomycine selon qu'elle a été incorporée au milieu avant ou après la coagulation. Ces différences sont relativement peu apparentes au vingt-deuxième jour, mais elles sont extrêmement prononcées au quarantième jour. Il y a de dix à cent fois plus de variants résistants sur chaque concentration de streptomycine lorsque celle-ci a subi la coagulation que lorsqu'elle a été incorporée au milieu après la coagulation.

3^o *Comparaison entre les deux milieux.* — Lorsque les deux antibiotiques ont été additionnés au milieu *après la coagulation*, les différences d'activité ne sont pas très importantes. Au vingt-deuxième jour, il n'y a de différences appréciables que pour la concentration de 2 µg/ml : sur cette concentration, le taux de variants résistants à la streptomycine est plus élevé qu'à la dihydrostreptomycine. Pour la concentration 4 µg, il n'y a pas de différence. Au quarantième jour, au contraire, les différences s'accentuent. Il y a, en moyenne, entre dix et cent fois plus de variants résistants à chaque concentration de streptomycine qu'aux concentrations correspondantes de dihydrostreptomycine.

Lorsque les deux antibiotiques ont été incorporés au milieu de Loewenstein-Jensen *avant la coagulation*, les différences entre streptomycine et dihydrostreptomycine sont très importantes. Ce fait confirme ce qui a été observé précédemment (fig. 3).

Un point mérite également d'être souligné : la dihydrostreptomycine incorporée *avant* la coagulation a une activité antibactérienne supérieure à celle de la streptomycine ajoutée *après* la coagulation.

Ainsi, les expériences qui viennent d'être rapportées montrent que, même si l'on élimine le facteur coagulation, l'activité anti-

bactérienne de la dihydrostreptomycine reste supérieure à celle de la streptomycine. Ce n'est donc pas le chauffage à 85°, c'est à-dire le degré d'inactivation des deux variétés de streptomycine par la chaleur, qui explique pour l'essentiel les différences d'activité constatées. Il faut dès lors se demander si ce n'est pas le milieu de Loewenstein-Jensen lui-même qui est, au premier chef, à l'origine de cette « inactivation » de la streptomycine. Les expériences suivantes tentent d'éclaircir ce point.

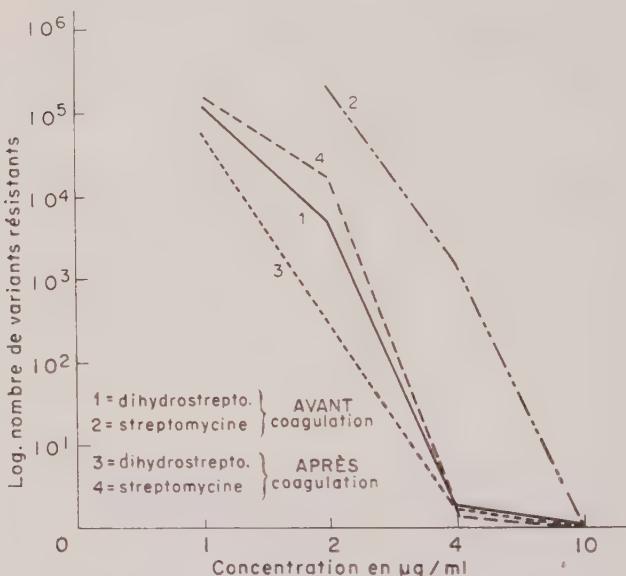


FIG. 3. — Nombre de variants résistants à la dihydrostreptomycine et à la streptomycine contenus dans 10^6 bacilles d'une souche sauvage (414) selon que l'antibiotique a été ajouté au milieu avant ou après coagulation (milieu de Loewenstein-Jensen ; lecture au quarantième jour).

D. — INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE EMPLOYÉ SUR LE TAUX DES VARIANTS RÉSISTANTS.

L'influence du milieu de culture a été étudiée par une série de titrages réalisés simultanément sur milieu de Loewenstein-Jensen et sur milieu de Dubos gélosé. Ces deux milieux représentent en effet deux types de milieu très différents : le premier est un milieu à l'œuf contenant de nombreuses substances organiques naturelles ; le deuxième, un milieu semi-synthétique gélosé contenant de l'acide oléique et de la fraction V d'albumine bovine.

Ainsi qu'on vient de le voir, la coagulation du milieu de Loewenstein-Jensen n'a qu'une influence limitée sur l'activité antibactérienne du sulfate de dihydrostreptomycine. Des titrages de souches sauvages réalisés simultanément sur des milieux de Loewenstein-Jensen et de Dubos gélosé, auxquels de la dihydrostreptomycine a été incorporée, permettent donc de préciser le rôle du milieu lui-même dans l'inactivation de l'antibiotique.

TECHNIQUE. — On prépare des tubes de milieu de Loewenstein-Jensen contenant 1, 2 et 4 µg/ml de dihydrostreptomycine, cet antibiotique étant incorporé au milieu avant la coagulation. On prépare simultanément des tubes de milieu de Dubos gélosé contenant 0,5, 1 et 2 µg/ml de dihydrostreptomycine. Cet antibiotique est incorporé au milieu en même temps que le glucose, l'acide oléique et l'albumine, le milieu étant à 56° C et se refroidissant rapidement. Tous les tubes sont ensuite ensemencés, comme dans les expériences précédentes, avec diverses dilutions d'une souche sauvage de bacilles tuberculeux en milieu de Dubos liquide. Sept souches sauvages ont été successivement testées.

RÉSULTATS. — Le tableau IV donne pour chacune des sept souches éprouvées le taux des variants résistants à la dihydrostreptomycine selon que le milieu de culture employé est le milieu de Loewenstein-Jensen ou le milieu de Dubos gélosé. On constate que la dihydrostreptomycine est beaucoup plus active lorsqu'elle est incorporée au milieu de Dubos gélosé que lorsqu'elle est incorporée au milieu de Loewenstein-Jensen. Une concentration très faible de dihydrostreptomycine (0,5 µg/ml) se montre déjà très active en milieu de Dubos gélosé : pour les sept souches, le nombre médian de variants résistants qui s'y développent est de 13 au vingtième jour, et de 82 au quarantième jour. Cette concentration de dihydrostreptomycine en milieu de Dubos gélosé se montre douée d'une activité antibactérienne intermédiaire à celle de 2 et 4 µg/ml en milieu de Loewenstein-Jensen (fig. 4). Il faut cependant remarquer que l'activité n'est pas la même sur toutes les souches : deux souches (414 et 415) donnent en effet sur 0,5 µg/ml et 1 µg/ml un taux assez important de variants résistants. Il s'agit d'un caractère propre à ces deux souches, puisqu'elles ont été testées sur le même lot de milieu de Dubos que la souche H37Rv, dont la richesse en variants résistants n'a pas été anormalement élevée.

Ainsi, la dihydrostreptomycine se montre douée d'une activité antibactérienne très différente selon le milieu auquel on l'incorpore. Elle est douée d'une très grande activité antibactérienne en milieu de Dubos gélosé. Elle est douée d'une activité antibactérienne bien plus faible en milieu de Loewenstein-Jensen, puisqu'il

TABLEAU IV. — Nombre de variants résistants à la dihydrostreptomycine contenus dans 10^6 bacilles de 7 souches sauvages selon le milieu de culture employé (milieu de Löwenstein-Jensen ou milieu de Dubos gélosé, dihydrostreptomycine incorporée).

SOUCHE	DATE DE LECTURE	MILIEU DE LOEWENSTEIN-JENSEN			MILIEU DE DUBOS GÉLOSÉ		
		1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml
410	26 ^e jour.....	120 000	6	2	10	5,4	2,6
	40 ^e jour.....	200 000	240	2	26	10,8	3,9
411	26 ^e jour.....	6 000	4	3	10	4,8	2
	40 ^e jour.....	50 000	100	4	11	4,8	3,7
412	26 ^e jour.....	500 000	> 10 000	2	5	3,2	1,4
	40 ^e jour.....	600 000	40 000	10	113	3,9	2
413	26 ^e jour.....	125 000	140	3	18	10	3,9
	40 ^e jour.....	330 000	1 700	48	82	10	4
414	26 ^e jour.....	200 000	> 400	9	8 000	80	12,5
	40 ^e jour.....	200 000	10 000	28	87 000	1 700	15
415	26 ^e jour.....	11 000	450	3	3 000	30	15
	40 ^e jour.....	300 000	6 000	15	9 000	440	70
H37Rv	26 ^e jour.....	10 000	80	0,2	13	7	3
	40 ^e jour.....	25 000	200	2	13	7	4
Nombre médian	26 ^e jour.....	120 000	140	3	13	7	3
	40 ^e jour.....	200 000	1 700	10	82	10	4

faut des concentrations environ quatre fois plus fortes pour obtenir un effet du même ordre. On peut conclure que c'est bien le milieu de culture lui-même qui est responsable, pour l'essentiel, de l'apparente inactivation de la dihydrostreptomycine en milieu de Loewenstein-Jensen.

Il est intéressant de noter qu'à l'égard de l'isoniazide, le milieu de Dubos gélosé a un effet opposé : il en diminue l'activité. Aussi

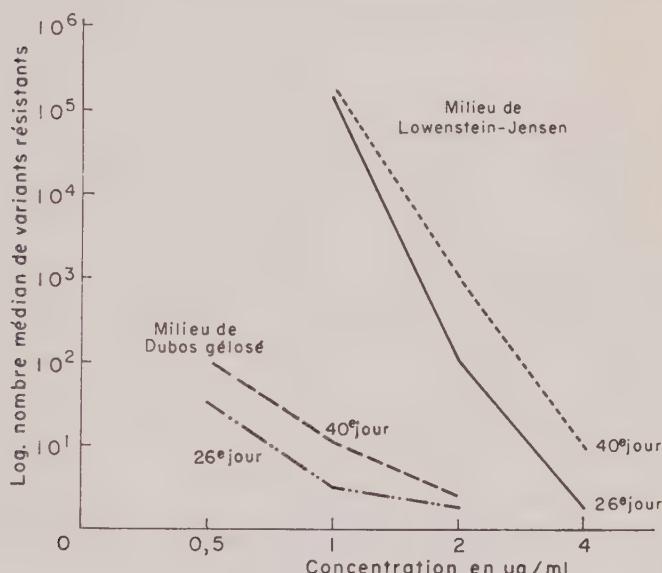


FIG. 4. — Nombre médian de variants résistants à la dihydrostreptomycine contenus dans 10^6 bacilles de 7 souches sauvages selon que le milieu de culture employé est le milieu de Loewenstein-Jensen ou le milieu de Dubos gélosé (lecture au vingt-sixième et au quarantième jour).

le comportement réciproque des milieux de Loewenstein-Jensen et de Dubos gélosé est-il inverse de celui signalé pour la dihydrostreptomycine : à concentration d'isoniazide égale, le nombre de variants résistants à l'isoniazide est notablement plus élevé sur milieu de Dubos gélosé que sur milieu de Loewenstein-Jensen. Le tableau V expose les chiffres notés pour deux souches sauvages.

Un nombre limité de souches ont été titrées comparativement sur milieu de Dubos gélosé contenant du sulfate de dihydrostreptomycine et sur du milieu de Dubos contenant du sulfate de streptomycine. Le tableau VI montre qu'au moins pour les trois souches

TABLEAU V. — Nombre de variants résistants à l'isoniazide contenus dans 10^6 bacilles de 2 souches sauvages de bacilles tuberculeux selon le milieu de culture employé (milieu de Löwenstein-Jensen ou milieu de Dubos gélosé, isoniazide incorporé).

SOUCHE	DATE DE LECTURE	LOEWENSTEIN-JENSEN (en $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'isoniazide)					DUBOS GÉLOSÉ (en $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'isoniazide)											
		0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	5	25	0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	5	25	
414	25 ^e jour ..	34	2	0,5	0,2	$<$	0,1	$<$	0,1	500 000	126	6	0,2	$<$	0,1	$<$	0,1	?
	40 ^e jour ..	56	2	1	0,5	0,4	0,2	0,2	0,2	500 000	130	11	7	1,3	$<$	0,1	$<$	0,1
H37Rv	25 ^e jour ..	7	2,1	1	0,5	$<$	0,1	$<$	0,1	0	67	2,5	1	0,8	0,4	0,4	0,4	0,1
	40 ^e jour ..	21	1	0,5	0,5	$<$	0,2	$<$	0,2	0	750	31	2,5	0,8	0,4	0,4	0,4	0,1

TABLEAU VI. — Nombre de variants résistants à la dihydrostreptomycine et à la streptomycine contenus dans 10^6 bacilles de 3 souches sauvages de bacilles tuberculeux (milieu de Dubos gélosé).

SOUCHE	DATE DE LECTURE	DIHYDROSTREPTOMYCINE (en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de milieu)					STREPTOMYCINE (en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de milieu)				
		0,12	0,25	0,50	1	2	0,12	0,25	0,50	1	2
414	26 ^e jour .. .	1 000 000	500 000	8 000	80	12,5	1 000 000	500 000	40 000	6	8
	40 ^e jour .. .	1 000 000	1 000 000	87 000	1 700	15	1 000 000	500 000	90 000	450	8
415	26 ^e jour .. .	1 000 000	50 000	3 000	30	15	1 000 000	1 000 000	10 000	?	0
	40 ^e jour .. .	1 000 000	80 000	9 000	440	70	1 000 000	1 000 000	20 000	750	0
H37Rv	26 ^e jour .. .	400 000	2 000	13	7	3	300 000	500 000	8	0	0
	40 ^e jour .. .	500 000	3 000	13	7	4	400 000	1 000 000	10	2	1

testées, les taux de variants résistants aux diverses concentrations de dihydrostreptomycine et de streptomycine sont sensiblement identiques. A une concentration de 0,25 µg/ml, la dihydrostreptomycine se montre légèrement plus active que la streptomycine, mais, pour les concentrations supérieures, l'activité des deux variétés d'antibiotique est équivalente. Ainsi, dans la mesure où ces essais peu nombreux permettent de se prononcer, la suppression de l'influence conjointe du milieu à l'œuf et du chauffage à 85° égalise l'activité antibacillaire de la streptomycine et de la dihydrostreptomycine.

DISCUSSION.

Les résultats des expériences qui viennent d'être rapportées appellent plusieurs commentaires. Les uns sont d'ordre théorique, les autres d'ordre pratique.

Du point de vue théorique, deux faits sont importants : d'une part, l'influence du milieu de culture sur l'activité anti-bactérienne de l'antibiotique qui lui a été incorporé et, d'autre part, les différences d'activité du sulfate de streptomycine et du sulfate de dihydrostreptomycine.

La streptomycine, que ce soit le sulfate de dihydrostreptomycine ou le sulfate de streptomycine, se montre beaucoup plus active lorsqu'elle est incorporée au milieu de Dubos gélosé que lorsqu'elle est incorporée au milieu de Loewenstein-Jensen. On a vu que ce n'est pas la coagulation que subit le milieu à l'œuf, c'est-à-dire le chauffage que subit l'antibiotique, qui explique cet état de choses. En effet, la dihydrostreptomycine a une activité sensiblement identique en milieu de Loewenstein-Jensen, qu'elle soit incorporée avant la coagulation ou ajoutée au milieu après la coagulation, et la streptomycine n'est que faiblement influencée par la chaleur. Ce sont donc des phénomènes chimiques ou physiques (du type fixation ou adsorption) qui sont à l'origine de la moindre activité des deux variétés de streptomycine en milieu de Loewenstein-Jensen qu'en milieu de Dubos gélosé, et non pas une altération de l'antibiotique par la chaleur. L'influence peu marquée de la chaleur sur l'activité de la streptomycine en milieu de Loewenstein-Jensen avait déjà été notée par Jensen [9].

Les différences d'activité entre le sulfate de dihydrostreptomycine et le sulfate de streptomycine, constatées en milieu de Loewenstein-Jensen, plaident également dans ce sens. Il est vraisemblable que c'est la légère différence de structure entre la molécule de la streptomycine et celle de la dihydrostreptomycine qui est à l'origine des différences d'activité entre les deux sels, la fonction aldéhyde de la streptomycine la rendant plus apte à des

combinaisons chimiques, et la chaleur jouant à son tour un rôle d'accélération des combinaisons chimiques.

Du point de vue pratique, deux faits se dégagent. Pour la réalisation des mesures de résistance, il y a lieu de préférer la dihydrostreptomycine à la streptomycine lorsque le milieu de culture employé est le milieu de Loewenstein-Jensen : l'interférence de facteurs totalement étrangers à la résistance réelle des souches, en est notablement diminuée. A l'heure actuelle, beaucoup de travaux concernant la streptomycino-résistance sont publiés sans indication sur la nature de la streptomycine incorporée dans le milieu de culture : il est probable que les divergences parfois considérables entre les résultats obtenus dans différents laboratoires pour une même souche sont dues, en partie, à la différence des streptomycines utilisées. Ce facteur ne joue cependant que si les concentrations-critiques adoptées sont basses : la cause principale des divergences réside presque toujours dans des différences de *semence*.

Les faits rapportés démontrent aussi que les critères de résistance à un antibiotique, quelle que soit la rigueur avec laquelle ils ont été établis, ne valent que pour un milieu de culture donné : le fait de les transposer sans vérification préalable à un milieu différent peut conduire à des erreurs assez graves. Les différences entre milieu de Loewenstein-Jensen et milieu de Dubos solide étudiées ici, fournissent à cet égard un exemple démonstratif. Tout milieu de culture appelé à servir à des déterminations de résistance doit donc d'abord être « étalonné » par rapport à l'antibiotique en cause. Encore faut-il étalonner avec précision : la seule manière d'y parvenir est de déterminer quantitativement, sur le milieu en question, le taux des variants résistants des souches sauvages.

RÉSUMÉ.

Ce travail étudie l'influence du milieu de culture et du sel de streptomycine sur le nombre des variants résistants à la streptomycine présents dans une souche sauvage de bacilles tuberculeux. En milieu de Loewenstein-Jensen, le sulfate de *streptomycine* incorporé au milieu avant la coagulation a une activité antibactérienne moins marquée que le sulfate de *dihydrostreptomycine*. L'activité des deux sels est très peu diminuée par l'augmentation de la durée de la coagulation. L'activité antibactérienne de la dihydrostreptomycine est la même lorsque l'antibiotique est ajouté au milieu de Loewenstein-Jensen avant la coagulation que lorsqu'il est ajouté après. L'activité antibactérienne de la streptomycine est au contraire beaucoup plus faible lorsque l'antibiotique est ajouté après. Même lorsque la streptomycine est ajoutée au milieu après

la coagulation, son activité reste inférieure à celle de la dihydrostreptomycine. La « thermolabilité » de l'antibiotique n'est donc pas la seule cause de son inactivation en milieu de Loewenstein-Jensen. Des titrages comparatifs réalisés sur milieu de Loewenstein-Jensen et sur milieu de Dubos gélosé montrent que c'est le milieu de Loewenstein-Jensen lui-même, et non la chaleur, qui est le responsable de l'inactivation. La nature exacte de l'inactivation et ses conséquences pratiques sont discutées.

SUMMARY

DIFFERENCES IN THE PERCENTAGE OF *Mycobacterium tuberculosis* STREPTOMYCIN-RESISTANT VARIANTS ACCORDING TO THE VARIETY OF STREPTOMYCIN AND THE CULTURE MEDIUM.

Study of the influence of the culture medium and the streptomycin salt used on the number of streptomycin-resistant variants present in a wild strain of tubercle bacillus.

In Loewenstein-Jensen *streptomycin sulfate* incorporated before inspissation has a less marked antibacterial activity than *dihydrostreptomycin sulfate*. The activity of both salts decreases very little in the case of prolongation of the inspissation.

The antibacterial activity of dihydrostreptomycin is the same when the antibiotic is added to Loewenstein-Jensen medium before or after inspissation. On the contrary, the activity of streptomycin is much lower when the antibiotic is added after inspissation. Even when added to the medium after inspissation, the activity of streptomycin is lower than that of dihydrostreptomycin. The thermolability of streptomycin is therefore not the only cause of its inactivation in Loewenstein-Jensen medium. Comparative titrations carried out in Loewenstein-Jensen and Dubos agar media show that the Loewenstein-Jensen medium itself, and not heat, is responsible for this inactivation. The actual nature of the inactivation and its practical consequences are discussed.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] BOGEN (E.). *Trans. 11th Conf. Chem. Tub.* V. A., 1952, 95-96.
- [2] CANETTI (G.) et GROSSET (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **101**, 28.
- [3] COLETSOS (P. J.), BOISVERT (H.) et ORIOT (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 288.
- [4] COLETSOS (P. J.). *Presse méd.*, 1951, **82**, 1772.
- [5] COLETSOS (P. J.). *Ann. biol. Clin.*, 1953, **10-12**, 563.
- [6] DRUMMOND (M. C.), LEWIS (G. T.) and CUMMINGS (M. M.). *Dis. Chest*, 1951, **2**, 158.

- [7] FISHER (M. W.). *Amer. Rev. Tuberc.*, 1948, **57**, 58.
- [8] HERROLD (R. D.). *J. inf. Dis.*, 1931, **48**, 236.
- [9] JENSEN (K. A.). *Bull. Un. int. Tuberc.*, 1954, **24**, 81.
- [10] PYLE (M.). *Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic*, 1947, **22**, 465.
- [11] RAKE (G.), PANSY (F. E.), JAMBOR (W. P.) and DONOVICK (R.).
Amer. Rev. Tuberc., 1948, **58**, 479.
- [11 bis] U. S. A. Veterans Administ. *Tuberculosis Laboratory Methods*, 1958.
- [12] WILLISTON (E. H.) and YOUNMANS (G. P.). *Amer. Rev. Tuberc.*, 1949, **59**, 336.
- [13] YOUNMANS (G. P.), ABDULLA (I.), SWEANY (J.) and SWEANY (H. C.).
Amer. Rev. Tuberc., 1950, **61**, 569.

ISOLEMENT ET PURIFICATION DES BACTÉRIES CELLULOLYTIQUES AÉROBIES DU SOL

par J. RIVIÈRE (*)

(avec la collaboration technique de R. ROUX).

*(Laboratoire de Microbiologie,
Institut National Agronomique, Paris ;
Société d'Etudes et d'Applications Biochimiques, Jouy-en-Josas)*

INTRODUCTION.

Les bactéries cellulolytiques aérobies représentent un groupe fort hétérogène et des techniques très différentes ont été utilisées pour les isoler. Tous les auteurs, selon Siu [10], sont d'accord pour employer la cellulose comme seule source de carbone et une solution nutritive minérale additionnée ou non d'extrait de levure. Le milieu est solidifié en plaques par le silico-gel [14, 6] ou la gélose si celle-ci est purifiée et ajoutée à faible concentration [7, 12]. La cellulose peut être insoluble, sous forme fibreuse (feuille de papier-filtre ou fragment de tissu) dans la technique initiale de Winogradsky [14], finement broyée après avoir été traitée ou non par divers acides donnant de la cellulose dite précipitée [7, 5, 12], ou rendue soluble par d'autres procédés à l'état de cellulose-dextrines [11, 4].

Ces techniques permettent un isolement relatif, mais les purifications par passage sur un milieu minéral gélosé additionné de glucose ou de cellulose précipitée sont aléatoires [12, 13]. La gélose, même purifiée, n'est pas favorable à certaines espèces (Charpentier [3]). D'ailleurs la plupart des souches de collection que nous avons eues entre les mains étaient impures ou n'avaient qu'un faible pouvoir cellulolytique.

(*) Société Française de Microbiologie séance du 13 avril 1961.

Ce travail a pour but de mettre au point une technique permettant d'obtenir à l'état de cultures pures les diverses bactéries cellulolytiques aérobies d'une terre donnée. Nous avons utilisé une terre de jachère dont nous connaissons bien les caractéristiques physiques, chimiques et bactériologiques [9].

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1^o CULTURES D'ENRICHISSEMENT. — On incorpore à 100 g de terre séchée à l'air et préalablement tamisée, 5 g de poudre de cellulose pour chromatographie (Whatman). Après avoir mélangé très soigneusement, on ajuste l'humidité à 20 p. 100, et le tout est mis dans une boîte de Petri de 12 cm de diamètre, puis porté à incuber à 28° C pendant huit jours, l'humidité étant maintenue constamment à sa valeur initiale.

2^o MILIEUX D'ISOLEMENT. — Etant donné la grande diversité des bactéries cellulolytiques aérobies signalées par Pochon [8], il est nécessaire d'employer plusieurs types de milieux soit gélosés, soit au silico-gel. Après de nombreux essais, deux milieux d'isolement ont été retenus et sont décrits ci-dessous. Nous avons pris comme souches tests les souches suivantes choisies pour leur pouvoir cellulolytique parmi un assez grand nombre en provenance des Etats-Unis, de Suède ou de France :

<i>Sporocytophaga myxococcoides</i>	QMB 482
<i>Cellulomonas flavigena</i>	QMB 528
<i>Cellulomonas biazotea</i>	QMB 525
<i>Cytophaga KM.</i>	

a) *Silico-gel.* — On prépare du silico-gel selon la technique de Winogradsky [14]. Après imprégnation, les plaques sont stérilisées en les soumettant cinq minutes à l'action d'une lampe à rayons ultra-violets. L'ensemencement se fait de la façon suivante : 5 g de la culture d'enrichissement sont soigneusement broyés dans un mortier avec 45 ml d'eau ajoutés en plusieurs fois, puis recueillis dans une fiole Erlenmeyer de 250 ml agitée cinq minutes dans un Microd Flask Shaker avant de faire les dilutions. II gouttes des diverses dilutions sont réparties à la surface des plaques ; si celles-ci sont bien sèches, les gouttes sont absorbées au bout de quelques heures (on utilise un compte-gouttes donnant XX gouttes au millilitre). L'incubation se fait à 28° C pendant huit jours. Ce milieu convient aux genres suivants : *Sporocytophaga*, *Cytophaga* et *Cellvibrio* dont la croissance est difficile en présence de gélose [3].

b) *Gélose à la cellulose.* — Sa composition est la suivante :

Cellulose en poudre (1)	5 g
NaNO ₃	1 g
PO ₄ HNa ₂ , 2 H ₂ O (Tampon M/150 pH : 6,8)	1,18 g
PO ₄ H ₂ K (Tampon M/150 pH : 6,8)	0,9 g
SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
Extrait de levure (Difco)	0,5 g
Hydrolysat de caséine (Difco)	0,5 g
Gélose Noble (Difco)	10 g
Eau q. s. p.	1 litre

Après stérilisation (vingt minutes à 120° C), ce milieu est coulé en plaques après avoir été bien agité pour que la poudre de cellulose soit répartie de façon homogène. Quand elles sont bien sèches, on y ensemence II gouttes de chaque dilution que l'on étale soigneusement sur toute la surface. L'incubation se fait à 28° C pendant huit jours. Ce milieu convient à toutes les autres bactéries cellulolytiques aérobies qui donnent des colonies généralement entourées d'une très petite zone de cellulolyse.

3° MILIEUX DE PURIFICATION. — La purification des bactéries cellulolytiques aérobies se fait aussi avec deux types de milieux différents suivant la façon dont elles ont été isolées.

a) *Gélose inclinée.* — Il s'agit d'une gélose à base de glucose stérilisée par filtration (0,1 p. 100).

Sa composition est voisine de la précédente, mais sans cellulose, et contient des peptones (0,1 p. 100 bacto-tryptone Difco). Après plusieurs passages on obtient des colonies dont la pureté est vérifiée par examen microscopique et également sur plaques.

b) *Milieu liquide additionné d'antibiotiques.* — Dans le cas des souches isolées sur silicogel (*Cytophaga* et *Sporocytophaga*), la purification sur gélose inclinée (Stanier [12]) est insuffisante. On obtient de bons résultats par passage dans des tubes de milieu liquide contenant une bande de papier-filtre de 1 × 6 cm (Durieux n° 111), et des concentrations croissantes de sulfate de kanamycine (kanamycine Bristol) : 2,5, 5, 10 mg par litre.

(1) La poudre de cellulose (Whatman) est mise à tremper dans de l'acide chlorhydrique N pendant douze heures, à froid, puis lavée sur Buchner pour éliminer l'acide avant d'être utilisée dans la préparation du milieu.

La composition du milieu est la suivante :

Bacto-tryptone (Difco)	1	g
NO ₃ Na	1	g
PO ₄ H ₂ K (Tampon M/150 pH : 6,8)	0,9	g
PO ₄ HNa ₂ , 2 H ₂ O (Tampon M/150 pH : 6,8)	1,18	g
SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	0,5	g
SO ₄ Fe, 7 H ₂ O	0,5	g
SO ₄ Mn, H ₂ O	traces	
Extrait de levure (Difco)	0,5	g
Eau q. s. p.	1 litre	

Après cinq passages (chaque repiquage se fait après huit jours d'incubation à 28° C), la pureté des souches est vérifiée par examen microscopique, également sur plaques et culture dans du bouillon nutritif. En effet, les *Cytophaga* et les *Sporocytophaga* ne présentent aucune croissance dans ce dernier milieu.

4° TEST D'ACTIVITÉ CELLULOLYTIQUE. — Selon Siu [10], le test le plus simple consiste à inoculer des bandes de papier filtre partiellement immergées dans une solution minérale. C'est ce que nous avons fait en utilisant le milieu précédent sans antibiotique : après huit jours d'incubation à 28° C, une légère agitation doit amener une désintégration du papier pour permettre de conclure qu'il y a un pouvoir cellulolytique notable.

TABLEAU I.

BACTÉRIES CELLULO- LYTIQUES AÉROBIES PURIFIÉES	MILIEUX D'ISOLEMENT		MILIEUX DE PURIFICATION				POUVOIR CELLULO- LYTIQUE	
	Silico- gel	Gélose à la cellulose	Gélose glucosée inclinée	Milieu liquide à la kanamycine (mg/litre)				
				2,5	5	10		
<i>Sporocytophaga</i> <i>myxococcoïdes</i> ..	+	+ o	+	+	+	+	moyen	
<i>Cytophaga</i> <i>hutchinsonii</i> ...	+	+ o	+	+	+	o	moyen	
<i>Cytophaga</i> <i>aurantiaca</i>	+	+ o	+	+	+	o	moyen	
<i>Cellulomonas</i> <i>flavigena</i>	o	+	+	o	o	o	fort	
<i>Cellvibrio</i> <i>ochraceus</i>	+	+ o	o	o	o	o	très faible	

+ : croissance nette permettant un isolement facile.

+ o : croissance ralentie rendant l'isolement délicat.

o : pas de croissance.

RÉSULTATS.

Les bactéries cellulolytiques aérobies ont été identifiées d'après les caractères donnés dans le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7^e édit., 1957). Parmi les souches isolées, seules quatre ont un pouvoir cellulolytique important :

Sporocytophaga myxococcoides,

Cytophaga hutchinsonii,

Cytophaga aurantiaca,

Cellulomonas flavigena, ce dernier étant de loin le plus cellulolytique. D'ailleurs son utilisation pratique dans l'épuration des eaux résiduaires de papeterie a apporté des améliorations notables (Brebion [4]). Nous pouvons résumer les résultats obtenus dans le tableau I.

DISCUSSION.

Il n'existe pas de technique unique pour isoler et purifier les bactéries cellulolytiques aérobies du sol. Quand on peut utiliser des milieux gélosés [5, 11, 4, 13], la méthode classique d'isolement et de purification donne des résultats très satisfaisants : toutes les souches de collection que nous avons pu nous procurer étaient pures, mais deux d'entre elles seulement avaient un réel pouvoir cellulolytique, *Cellulomonas flavigena* QMB 528, et *Cellulomonas biazotea* QMB 525. Pour les autres, en particulier dans le cas des *Cytophaga* et des *Sporocytophaga*, il semble que la gélose, même purifiée, possède une action inhibitrice, comme le signale Charpentier [3] : la croissance est lente, peu de colonies apparaissent, généralement de très petites dimensions, rendant les repiquages difficiles. Le silico-gel permet, au contraire, d'obtenir un isolement assez aisé, mais la purification est impossible : en effet, les colonies sont toujours plus ou moins muqueuses et constituées, à côté des bactéries cellulolytiques aérobies, de contaminants muqueux que l'on retrouve soit dans les souches de collection, soit dans les souches que nous avons isolées, quelles que soient les purifications classiques [5, 12]. C'est un travail de Chalvignac [2] sur l'emploi des antibiotiques dans la purification des *Cellvibrio* qui nous a donné l'idée d'en faire l'essai avec les *Cytophaga* et les *Sporocytophaga*. Nous avons utilisé, à diverses concentrations, tous les antibiotiques que nous avons pu nous procurer, et seul le sulfate de kanamycine nous a permis d'obtenir une purification totale après un certain nombre de passages.

Les souches pures ont d'ailleurs un pouvoir cellulolytique aussi élevé que lorsqu'elles sont contaminées. Il semble qu'il y ait une sorte d'association étroite entre certaines souches de *Sporocytophaga* et une bactérie muqueuse que nous étudions actuellement.

RÉSUMÉ.

L'emploi de silico-gel recouvert de papier-filtre et d'une gélose à la cellulose permet d'isoler les bactéries cellulolytiques aérobies du sol. La purification des *Cytophaga* et des *Sporocytophaga* se fait aisément en milieu liquide à l'aide du sulfate de kanamycine.

SUMMARY

ISOLATION AND PURIFICATION OF AEROBIC CELLULOLYTIC SOIL BACTERIA.

The use of a silico-gel covered with filter-paper and agar allows to isolate aerobic cellulolytic soil bacteria. The purification of *Cytophaga* and *Sporocytophaga* is easily carried out in liquid medium by means of kanamycin sulfate.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BREBION (M.). 1961 (non publié, communication personnelle).
- [2] CHALVIGNAC (M. A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 417.
- [3] CHARPENTIER (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 153.
- [4] FULLER (W. H.) et NORMAN (J. K.). *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, 1954, **9**, 64.
- [5] HULCHER (F. H.) et KING (K. W.). *J. Bact.*, 1958, **76**, 565.
- [6] IMCHENETSKY (A. A.) et SOLNTSEVA (L. L.). *C. R. Acad. Sci., U. R. S. S.*, Série Biol., 1936, **6**, 1115.
- [7] JENSEN (H. L.). *Proc. Linnean Soc. N. S. W.*, 1940, **65**, 543.
- [8] POCHON (J.) et BARJAC (H. de). *Traité de Microbiologie des Sols*, Dunod éd., Paris, 1958, 192.
- [9] RIVIÈRE (J.). *Thèse Sci.*, Paris, 1959.
- [10] SIU (R. G. H.). *Microbial Decomposition of Cellulose*, Reinhold Publishing Corporation. New York, 1951, 106.
- [11] SKINNER (F. A.). *J. gen. Microbiol.*, 1960, **22**, 539.
- [12] STANIER (R. Y.). *Bact. Rev.*, 1942, **6**, 143.
- [13] VOETS et VAN HOVE (J. K.). *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, 1954, **9**, 64.
- [14] WINOGRADSKY (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1929, **43**, 549.

L'ENCÉPHALITE VERNO-ESTIVALE RUSSE EXPÉRIMENTALE DE LA SOURIS

SYSTÉMATIQUE DES LÉSIONS ET ÉTUDE ANATOMO-CLINIQUE
DES CRISES CONVULSIVES

par J. TAMALET, M. TOGA et R. VIGNOLI (*).

(*Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine
et Unité de Recherches Neurobiologiques de l'I.N.H.
[Professeur GASTAUT], Marseille*)

Depuis l'isolement, en 1937, du virus de l'encéphalite verno-estivale russe, de très nombreuses études expérimentales ont été effectuées ; la morphologie des lésions encéphalitiques chez l'animal est bien connue (Kovac et Moritsch [1]). Mais, si la topographie des lésions chez l'homme a été décrite par les auteurs russes, la systématisation des lésions encéphalitiques de la souris infectée expérimentalement nous a paru intéressante à étudier.

Nous avons réalisé en outre une étude expérimentale des crises convulsives des animaux malades, mettant en évidence leur potentiel épileptogène par la technique de Morgan et Waldman, qui ont réussi à provoquer des crises convulsives « audiogènes » chez des rats et des souris albinos d'apparence normale au moyen de vibrations sonores.

Chez l'homme, les lésions prédominent dans les noyaux gris centraux, la protubérance, le bulbe, le cervelet ; l'atteinte de l'écorce est variable. Comme le souligne Radermecker [2], les localisations sont surtout griscales et rappellent beaucoup la poliomylérite antérieure aiguë. La topographie lésionnelle est-elle analogue chez l'animal ? C'est l'objet de la deuxième partie de notre travail.

(*) Manuscrit reçu le 16 mars 1961.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

Des souris blanches suisses, âgées de 4 à 6 semaines, d'un poids moyen de 10 à 15 g, ont reçu par voie intracérébrale, et sous un volume de 0,03 ml, 5 000 DL₅₀ d'un virus biphasique de l'encéphalite verno-estivale russe (1) ou 50 000 DL₅₀ sous un volume de 0,3 ml par voie intraperitoneale.

La symptomatologie encéphalitique après inoculation par l'une ou l'autre voie apparaît vers le cinquième jour ; elle est caractérisée par des phénomènes d'hyperexcitabilité, le hérissement des poils, des clonies légères, la rigidité de la queue, une hypersensibilité au bruit, puis des troubles moteurs du train postérieur, de l'incoordination et parfois des crises d'épilepsie spontanée. La maladie évolue vers la mort en vingt-quatre ou trente-six heures. Les animaux étudiés anatomiquement ont été sacrifiés dans le coma ou quand ils présentaient des troubles moteurs nets.

LES CRISES CONVULSIVES AUDIOGÈNES.

Avant l'inoculation, les animaux ont été éprouvés individuellement trois fois à vingt-quatre heures d'intervalle, par agitation d'un trousseau de clefs à 30 cm de distance pendant trois minutes.

Ce stimulus sonore nous a paru plus efficace qu'une sonnerie électrique, bien que moins régulier ; les souris présentant une crise convulsive à l'une de ces épreuves (20 p. 100 environ des animaux) ont été éliminées ; seuls les sujets réfractaires ont été inoculés.

Nous avons recherché s'il était possible de provoquer des crises convulsives audiogènes, et avec quelle fréquence, chez ces animaux devenus encéphalitiques. Un lot témoin de 17 souris a reçu, par voie intracranienne, 0,03 ml d'une émulsion cérébrale de souris normale afin de contrôler les incidences du traumatisme encéphalique. Un deuxième lot de 18 animaux a été inoculé par voie intracérébrale avec du virus, et un troisième lot de 35 souris a reçu une injection de virus par voie intraperitoneale.

Chez les animaux inoculés avec du virus, les crises convulsives audiogènes apparaissent souvent en même temps que les premières manifestations cliniques d'encéphalite, après un temps d'excitation sonore de cinq à vingt secondes. Les crises audiogènes aggravent le tableau clinique et abrègent l'évolution fatale. A la suite des stimuli sonores, 3 animaux ont présenté un état de mal convulsif entraînant la mort en une à trois heures. Cependant,

(1) Cette souche nous a été remise par le Dr van Tongeren, à Leyde.

9 animaux malades (17 p. 100 de l'ensemble) sont restés réfractaires aux crises audiogènes jusqu'au coma terminal. Trois souris ont présenté des crises d'épilepsie spontanées en tous points semblables aux crises audiogènes qu'on pouvait provoquer chez elles par ailleurs. Sauf dans un cas, le traumatisme causé par l'inoculation de cerveau normal, s'est révélé incapable de sensibiliser les animaux (tableau I).

TABLEAU I.

	NOMBRE DE SOURIS INOCULÉES	NOMBRE CUMULATIF D'ANIMAUX PRÉSENTANT DES CRISES AUDIогÈNES		
		au 4 ^e jour	au 5 ^e jour	au 6 ^e jour
Virus intracérébral	18	3	12	16
Virus intrapéritonéal	35	7	16	28
Cerveau normal intracérébral.	17	0	1	1

ETUDE ANATOMIQUE DES LÉSIONS.

Les encéphales de 21 souris ont été examinés sur des coupes séries antéro-postérieures par les techniques histologiques courantes.

A. — *Trois animaux inoculés par voie intracérébrale.*

Les lésions anatomiques sont identiques dans ces trois cas ; elles comportent une inflammation périvasculaire lymphocytique adventitielle et gliale, une hyperplasie diffuse et nodulaire de la microglie. Aux éléments de l'inflammation productive s'associent des phénomènes exsudatifs importants (œdème de la trame, imbibition séreuse des gaines de Virchow-Robin).

Les lésions inflammatoires intéressent le cortex dans son ensemble, mais prédominent sur les structures profondes de la base du cerveau (thalamus, diencéphale) ; le bulbe et la protubérance sont également altérés.

On observe dans ces trois cas un foyer de nécrose cortico-sous-cortical correspondant au point d'inoculation.

Les lésions inflammatoires sont majeures autour de ce foyer, gênant l'interprétation de la topographie lésionnelle. Pour ces raisons, tous les autres animaux étudiés anatomiquement ont été inoculés par voie intrapéritonéale.

B. — *Etude anatomique analytique de huit cerveaux de souris inoculées par voie intrapéritonéale.*

CAS n° 1. — Lésions inflammatoires minimes réparties électivement sur le tronc cérébral inférieur (bulbe et pont).

CAS nos 2 et 3. — Lésions inflammatoires exsudatives et productives sévères dont la systématisation est la suivante : thalamus, substance grise périventriculaire et mésencéphale. Le tronc cérébral inférieur présente des lésions moins intenses. Le cortex cérébral et le rhinencéphale sont à peu près indemnes.

CAS n° 4. — Lésions inflammatoires graves, étendues, de caractère essentiellement productif (infiltrats périvasculaires, nodules gliaux), prédominant nettement sur les noyaux thalamiques et le diencéphale.

La région périaqueducale et le plancher du 4^e ventricule ne sont pas épargnés. Le cortex cérébral, le rhinencéphale et le cervelet sont intacts.

CAS n° 5. — Les lésions inflammatoires sont plus discrètes que dans le cas précédent ; leur topographie est cependant identique. On note une inflammation épendynaire et rhinencéphalique au contact de la corne sphénoïdale du ventricule latéral.

CAS n° 6. — L'inflammation productive revêt un caractère massif et diffus. Les lésions siègent sur toute l'étendue du tronc cérébral (bulbe, pont, mésencéphale) ; elles intéressent les structures profondes de la base (thalamus, strié) et ne respectent pas le néocortex ni le rhinencéphale. Seul le cervelet est indemne.

CAS n° 7. — Lésions inflammatoires graves, intenses, prédominant nettement sur le diencéphale, autour du 3^e ventricule, et atteignant également le mésencéphale. Le cortex cérébral et le tronc cérébral inférieur sont peu altérés.

CAS n° 8. — Inflammation surtout exsudative d'intensité modérée. Lésions productives peu apparentes et sans systématisation précise.

Dans l'étude anatomique des 10 animaux suivants, nous avons établi une distinction entre ceux qui n'ont pas présenté de crises convulsives pendant leur maladie et ceux qui ont eu des manifestations cliniques paroxystiques spontanées ou provoquées.

C. — *Lésions encéphalitiques de quatre animaux inoculés par voie intrapéritonéale et n'ayant pas présenté de crises audiogènes.*

a) *Deux cerveaux montrent essentiellement des lésions du tronc cérébral inférieur.*

CAS n° 1. — Forte inflammation exsudative et productive exclusivement localisée à la calotte bulbo-protubérantielle et au plancher du 4^e ventricule. Les autres régions du cerveau et le tronc cérébral supérieur ne sont pas altérés.

CAS n° 2. — Inflammation productive nette de la calotte du tronc cérébral inférieur (bulbe et pont). Les lésions les plus importantes siègent au niveau du plancher du 4^e ventricule. Le thalamus, le mésodiencéphale et le cortex sont peu altérés.

b) *Deux cerveaux présentent des lésions généralisées.*

CAS n° 3. — Les lésions inflammatoires sont d'une gravité et d'une intensité remarquables. Elles s'étendent à l'ensemble des structures cérébrales. Les altérations du cortex, des noyaux striés, du thalamus et du mésodiencéphale sont massives. La calotte bulbopontique est également lésée.

CAS n° 4. — Lésions inflammatoires généralisées d'une intensité considérable, comparables à celles du cas précédent, s'inscrivant sur le cortex, les structures nucléaires de la base et le tronc cérébral, sans prédominance particulière.

D. — *Lésions cérébrales de six animaux inoculés par voie intrapéritonéale et ayant présenté des crises audiogènes.*

CAS n° 1. — Inflammation massive de topographie thalamo-diencéphalique. Altérations relativement discrètes de la région péliaqueducale et de la calotte pontique ; le néocortex et le rhinencéphale ne montrent pas de lésions appréciables.

CAS n° 2. — On observe également dans ce cas une inflammation massive thalamo-diencéphalique ; altérations très discrètes du mésencéphale, du bulbe et du pont. Le rhinencéphale est indemne ; on note cependant quelques nodules inflammatoires sur le cortex temporal.

CAS n° 3. — Inflammation productive localisée aux noyaux thalamiques et au diencéphale. Le cortex cérébral est intact. On observe quelques nodules inflammatoires au niveau de la région péliaqueducale et du plancher du 4^e ventricule.

CAS n° 4. — Les lésions inflammatoires ont un caractère essentiellement exsudatif. L'inflammation productive est minime et sans systématisation élective appréciable.

CAS n° 5. — Forte inflammation productive (infiltrats périvasculaires, nodules gliaux) prédominant sur la région thalamo-diencéphalique et s'étendant en diminuant légèrement d'intensité sur le tronc cérébral inférieur. On observe quelques lésions corticales modérées ; le rhinencéphale est indemne.

CAS n° 6. — L'encéphale de cet animal, qui avait présenté des crises audiogènes et des crises convulsives spontanées, montre une inflammation importante à deux composantes, à la fois productive et exsudative, prédominant sur la substance grise périventriculaire, le thalamus interne et le diencéphale. La calotte mésencéphalopontique est également très altérée. Le cortex et l'hippocampe sont indemnes.

DISCUSSION.

1^o Caractères des lésions encéphalitiques.

A. — *Du point de vue morphologique*, les lésions anatomiques observées sont caractéristiques des encéphalites virales primitives. Elles comportent des aspects exsudatifs, productifs et dégénératifs.

Les lésions exsudatives ont été seules observées dans les deux cas, mais elles sont associées le plus souvent à des lésions productives. Les phénomènes exsudatifs sont caractérisés par un œdème de la trame nerveuse prédominant dans les couches moléculaires du cortex et de la substance blanche ; les vaisseaux sont dilatés et congestifs (pl. I, fig. 2) : l'espace de Virchow-Robin est infiltré par un exsudat plasmatique.

Les lésions productives, presque constantes, sont hautement caractéristique ; elles se manifestent essentiellement par des infiltrats périvasculaires et une hyperplasie gliale (pl. I, fig. 1). Les infiltrats périvasculaires (pl. II, fig. 3) réalisent des manchons cellulaires plus ou moins denses autour des vaisseaux de petit calibre. Les cellules constituant ces infiltrats ont une triple origine : hématogènes, il s'agit le plus souvent de lymphocytes, plus rarement de polynucléaires ; adventitiales, elles ont un aspect d'histiocytes spumeux ; quelquefois gliales, elles répondent aux éléments de la microglie. L'hyperplasie gliale peut être diffuse ou nodulaire. Ces nodules gliaux (pl. II, fig. 4), caractéristiques des encéphalites primitives, sont constitués par des éléments cellulaires polymorphes provenant de l'avantice des parois vasculaires et surtout du secteur mésodermique de la névrogliie, la microglie.

Les aspects dégénératifs sont minimes dans les cas examinés. On n'observe pas de foyers de nécrose ; les destructions neuronales sont infimes, il n'y a pas d'atteinte myélinique ou axonale. Nous n'avons pas noté d'inclusions de type viral dans le noyau ou le cytoplasme des neurones. Quelques cellules nerveuses présentent les éléments caractéristiques de la maladie aiguë de Nissl, au contact des nodules inflammatoires les plus importants et les plus denses ; des aspects de satellitose et quelquefois même de neurophagie ont été observés. Nous n'avons pas noté de lésions

PLANCHE I

FIG. 1 et 2. — Vue d'ensemble des lésions : congestion et dilatation des vaisseaux, infiltrations périvasculaires, nodules gliaux, hyperplasie cellulaire diffuse.

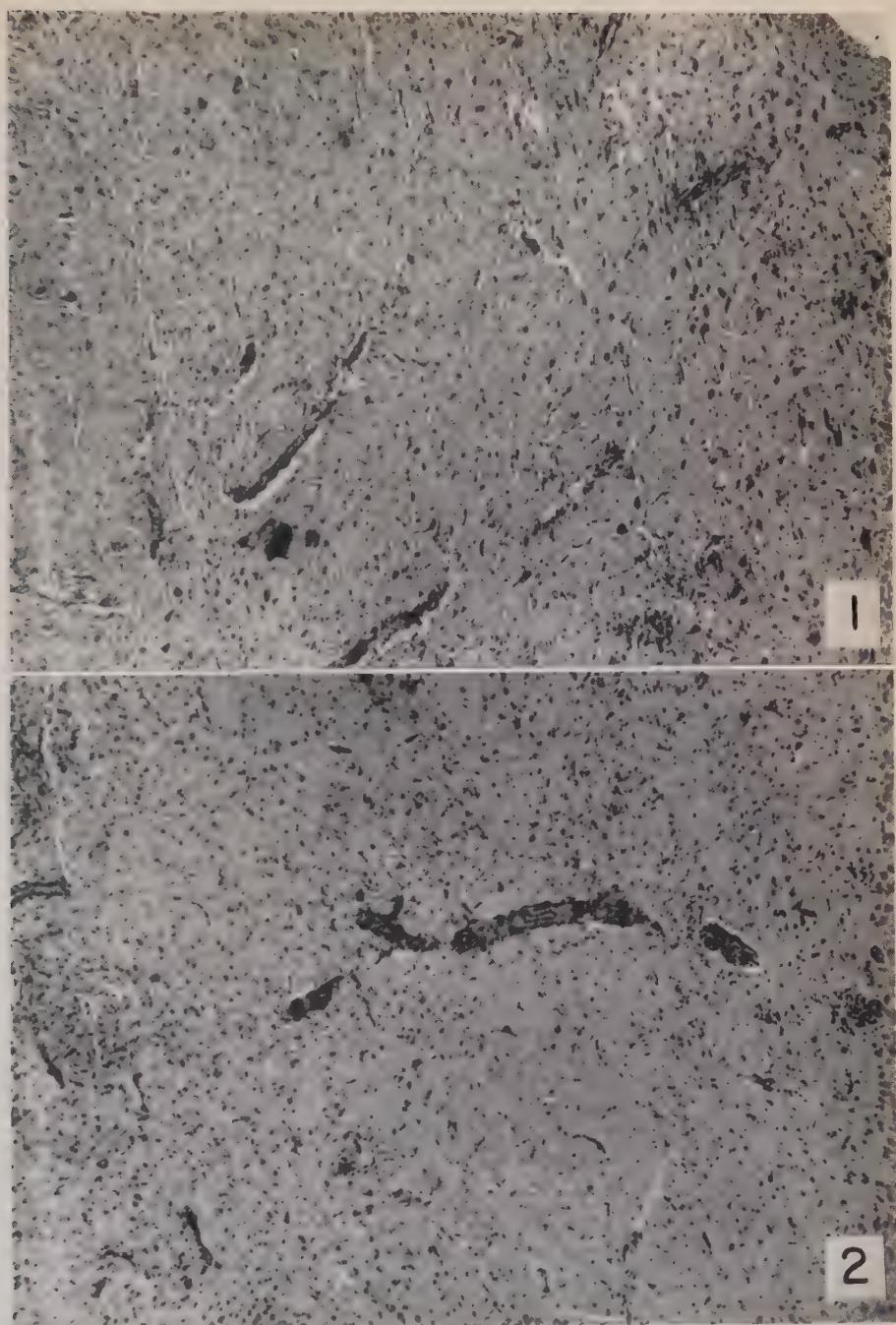


PLANCHE 1

PLANCHE II

FIG. 3. — Infiltration périvasculaire constituée par un manchon lymphocytaire et adventiciel autour d'un vaisseau congestif.

FIG. 4. — Nodule parenchymateux constitué d'éléments cellulaires polymorphes, microgliaux et adventiciels.

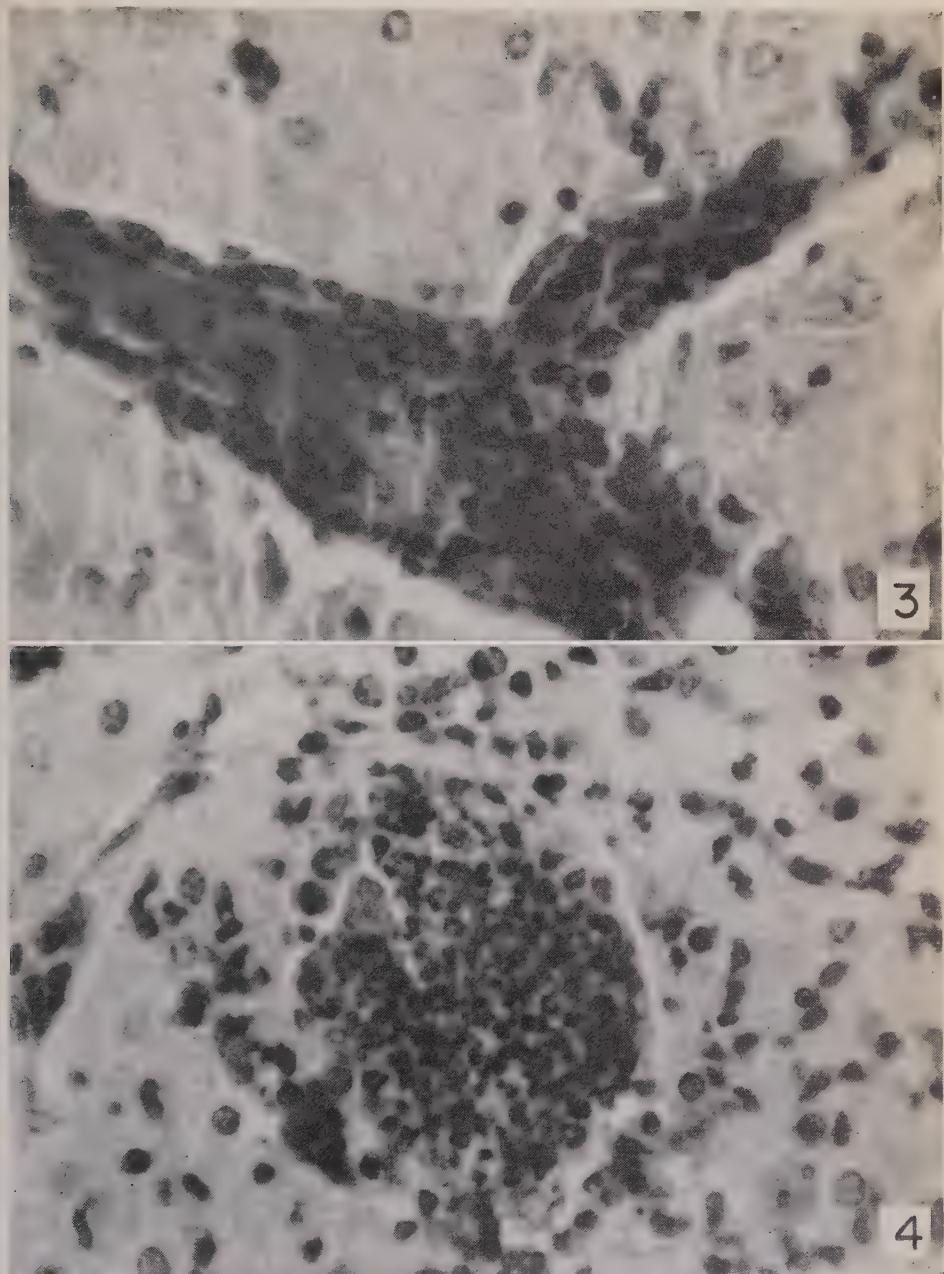


PLANCHE II.

neuronales dégénératives ou anoxiques à localisation corticale ou rhinencéphalique, susceptibles d'être reliées aux crises convulsives présentées en cours d'évolution par ces animaux.

B. — *Sur le plan topographique*, l'étude systématique des lésions inflammatoires permet de rattacher nos cas aux encéphalites griséales à prédominance basale les plus caractéristiques



FIG. 1. — Répartition des lésions : atteinte majeure des structures nucléaires basales ; isocortex relativement moins altéré ; hippocampe intact.

telles que la rage, la maladie de Von Economo, la poliomyélite ou la maladie de Borna du cheval.

Si on élimine les trois cas d'encéphalite obtenus après inoculation intracérébrale et ne permettant pas une étude systématique correcte, les encéphales de tous les autres animaux ont montré une répartition élective des lésions. Celles-ci prédominent, en effet, sur le tronc cérébral, du collet du bulbe aux noyaux thalamiques internes. Le thalamo-diencéphale (fig. 1), la substance grise périventriculaire, la région périaqueducale (fig. 2), la calotte ponto-bulbaire et le plancher du quatrième ventricule (fig. 3) sont altérés avec préférence. Le cortex cérébelleux, le rhinencéphale et le néocortex cérébral sont pratiquement indemnes dans la

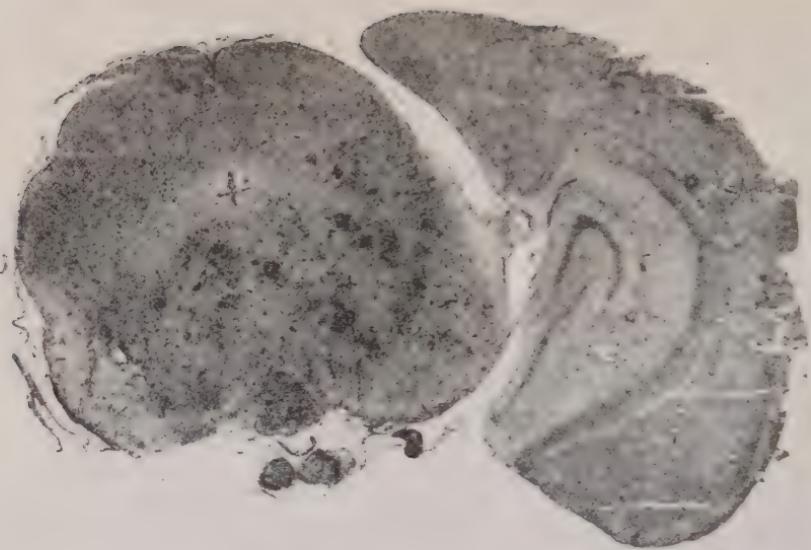


FIG. 2. — Répartition des lésions : atteinte élective du mésencéphale dans la région péraqueducale.

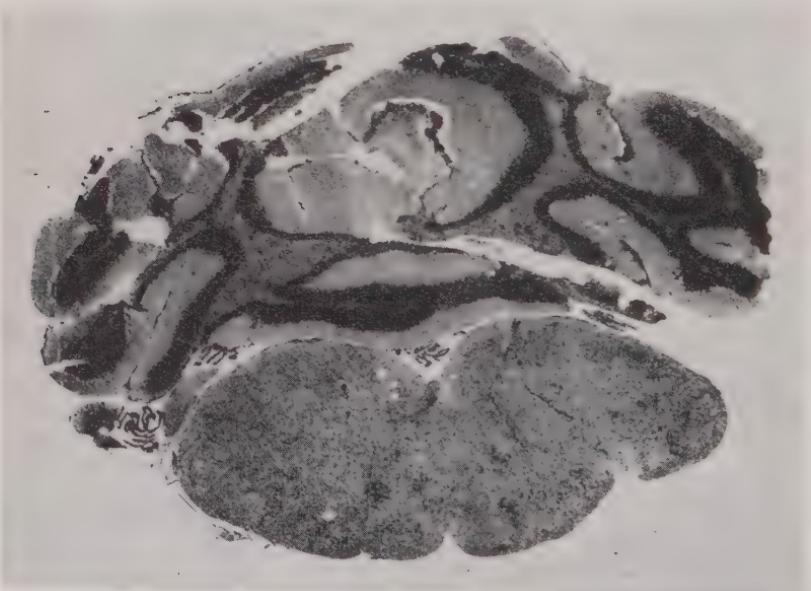


FIG. 3. — Répartition des lésions : infiltrations périvasculaires et nodules gliaux au niveau du bulbe ; lamelles cérébelleuses intactes.

plupart des cas. Deux cerveaux cependant ont présenté des lésions inflammatoires massives diffuses, généralisées à l'ensemble des structures cérébrales (cortex, formations thalamo-striées, mésodiencephale, tronc cérébral inférieur).

2^o Essai d'interprétation anatomo-clinique des crises convulsives audiogènes et spontanées.

Nous avons recherché s'il existait une corrélation entre la répartition des lésions anatomiques d'une part, et d'autre part, la survenue de crises épileptiques au cours de l'évolution clinique. Nous avons constaté que les cerveaux de tous les animaux ayant présenté des crises convulsives cliniques, spontanées ou audiogènes, montraient des lésions inflammatoires typiques étendues à l'ensemble du tronc cérébral mais prédominant sur les formations thalamo-diencéphaliques ; au contraire, les encéphales des souris chez lesquelles nous n'avons observé aucune crise épileptique présentent des lésions inflammatoires localisées électivement au tronc cérébral inférieur (plancher du quatrième ventricule, calotte bulbo-pontique, région péréiaqueducale), mais il n'y a jamais chez ces animaux d'altération des noyaux thalamiques ni du diencéphale.

L'interprétation de ces constatations est purement hypothétique, mais il semble que l'on puisse envisager deux mécanismes principaux. Un mécanisme direct, selon lequel les lésions inflammatoires thalamo-diencéphaliques, abaissant le seuil convulsivant de ces structures anatomiques, entretiennent à leur niveau une activité paroxystique responsable des décharges épileptiques. Un mécanisme indirect d'après lequel les lésions inflammatoires thalamo-diencéphaliques, modifiant les connexions cortico-thalamiques et thalamo-corticales, induisent une activité paroxystique née des structures profondes mais exprimée sur le cortex cérébral. Des lésions corticales, néocorticales ou hippocampiques n'ont été observées que dans deux cas. De nature inflammatoire, elles étaient associées à des altérations massives, diffuses, des autres régions du cerveau (thalamus, tronc cérébral inférieur). Les deux animaux qui en étaient porteurs sont morts rapidement et n'ont pas présenté de crises épileptiques. L'importance des lésions anatomiques dans ces deux cas n'a sans doute pas permis aux neurones corticaux ou thalamiques d'exprimer une activité paroxystique qui nécessite une conservation relative des cellules nerveuses et des voies anatomiques. Il est intéressant de souligner que les territoires « d'invulnérabilité sélective » (hippocampe, troisième couche du cortex, lamelles cérébelleuses) sont dans tous les cas parfaitement indemnes de lésions anoxiques ou ischémiques. Les crises audiogènes et les crises spontanées sans état de mal n'entraînent

pas de lésions cérébrales secondaires post-critiques : ce fait, observé déjà par nous dans les observations anatomo-cliniques et expérimentales antérieures, paraît infirmer les théories angiospastiques et pathoclytiques de l'école allemande (Vogt, Spliemyer, Sholz).

CONCLUSIONS.

1^o 53 souris ont été inoculées par voie intracérébrale ou intraperitoneale avec une souche de virus de l'encéphalite verno-estivale russe biphasique. Pendant l'évolution de la maladie expérimentale, trois animaux ont présenté des crises d'épilepsie spontanées et 41 autres des crises convulsives audiogènes provoquées par des stimuli sonores entretenus.

2^o L'examen anatomique de l'encéphale de 18 souris inoculées par voie péritonéale a montré des aspects caractéristiques d'une encéphalite virale primitive (congestion vasculaire, œdème, infiltrats périvasculaires et nodules gliaux). Les lésions prédominent sur le tronc cérébral inférieur et supérieur. La substance grise corticale et la substance blanche sont généralement indemnes.

3^o Des corrélations peuvent être établies entre l'apparition des crises épileptiques et la systématisation des lésions anatomiques. Les animaux qui n'ont pas présenté de crises épileptiques spontanées ou provoquées montrent des lésions inflammatoires du tronc cérébral inférieur. Au contraire, les animaux épileptiques présentent des atteintes inflammatoires plus diffuses, intéressant le tronc cérébral inférieur et surtout supérieur (thalamus, diencéphale). L'interprétation de ces faits est discutée.

SUMMARY.

EXPERIMENTAL RUSSIAN SPRING-SUMMER ENCEPHALITIS IN MICE.

1. Fifty-three mice were inoculated intracerebrally or intraperitoneally with a strain of Russian spring-summer encephalitis virus. In the course of the disease, three animals had spontaneous attacks of epilepsy and 41 others audiogenic convulsions, induced by acoustic stimuli.

2. Anatomical study of the brain of eighteen intraperitoneally inoculated mice showed characteristic primitive viral encephalitis lesions (vascular congestion, perivascular infiltration and glial nodules). These were predominant on the inferior and superior brain stem. The cortical substantia grisea and substantia alba were generally undamaged.

3. Relationships can be demonstrated between appearance of epileptic fits and localization of anatomical lesions. Mice showing

neither spontaneous nor provoked epileptic fits, had inflammatory lesions of the inferior brain stem. On the contrary, epileptic mice showed more diffuse inflammatory alterations, in the inferior and especially superior brain stem (thalamus, diencephalon). The interpretation of these facts is discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KOVAC (W.) et MORITSCH (H.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1959, **174**, 440-456.
- [2] RADERMECKER (J.). *Systématique et électroencéphalographie des encéphalites et encéphalopathies*, 1956, Masson.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1960

par R. BÉQUIGNON et Ch. VIALAT.

(*Institut Pasteur*)

1^o PERSONNES TRAITÉES. — 477 personnes mordues se sont présentées à la consultation du Service de la Rage. A 78 le traitement a été conseillé et 52 l'ont subi.

2^o MÉTHODE DE TRAITEMENT. — La méthode employée est la méthode des vaccins phéniqués (Fermi). Emulsion à 5 p. 100 de matière cérébrale de mouton succombant au virus fixe, dans l'eau physiologique phéniquée à 1 p. 100. On emploie exclusivement, pour la préparation du vaccin, de jeunes moutons en bon état de santé, d'un poids moyen de 30 kg, dont l'encéphale pèse environ 90 à 100 g. Après inoculation intracérébrale, ils sont sacrifiés le huitième jour et leur encéphale extrait ; après contrôle de virulence et de stérilité, les cerveaux sont broyés et 5 parties de broyat de cerveau sont émulsionnées dans 100 parties d'eau physiologique phéniquée à 1 p. 100, puis la suspension est placée vingt-quatre heures dans une étuve à 22° C, avant d'être mise en ampoules. Les ampoules de vaccin sont conservées pendant dix jours à la température de 2° C à 5° C, avant d'être livrées. Chaque jour, les sujets en traitement reçoivent une ampoule de 5 ml (demi-dose pour les enfants) par voie sous-cutanée au niveau de la région péri-ombilicale. Le traitement a une durée de quinze, vingt ou trente jours selon le siège et la gravité des morsures.

Le virus fixe utilisé représentait, le 31 décembre 1960, le 2 004^e passage de la souche isolée par Pasteur le 19 novembre 1882 et employée pour la vaccination à partir du 90^e passage lors de la création du Service de la Rage, rue d'Ulm. La souche est entretenue sur le lapin.

Le contrôle de la valeur antigénique du vaccin antirabique phéniqué est effectué sur lapin selon une épreuve publiée antérieurement (Béquignon et Vialat [1]).

Depuis le 25 février 1955, l'approvisionnement en sérum antirabique purifié permet l'usage de cette prophylaxie, dans les morsures récentes. La vaccination est, par prudence, mise en œuvre à la suite de cette prophylaxie dans les cas de suspicion de rage. Dans les cas où la suspicion de rage est peu probable et permet d'attendre la lecture des coupes histologiques du névraxe de l'animal mordeur, le sérum seul a été utilisé pour la prophylaxie.

3° RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES D'APRÈS LE TERRITOIRE SUR LEQUEL ELLES ONT ÉTÉ MORDUES :

Algérie	4
Côte d'Ivoire	5
Etats-Unis d'Amérique	1
France	32
Haute-Volta	1
Maroc	4
Soudan	1
Tunisie	4

4° RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES SUIVANT L'ANIMAL MORDEUR :

Chien de propriétaires connus	14
Chien errant	34
Chat errant	2
Singe	1
Renard	1

5° RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES D'APRÈS LES PREUVES DE RAGE CHEZ L'ANIMAL MORDEUR :

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par le développement de la maladie chez des animaux inoculés avec le cerveau ou par examen histologique.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Catégorie A	0
Catégorie B	0
Catégorie C	52

Les névraxes de 188 animaux ont été examinés par le Service de la Rage. Cent soixante-dix-sept fois les commémoratifs de la morsure de l'animal et l'examen histologique du système nerveux

nous ont autorisés à ne pas instituer ou à suspendre le traitement chez les personnes mordues.

Les principes généraux qui ont dicté cette décision ont été rappelés dans un rapport précédent [2].

6^e RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES D'APRÈS LES CARACTÈRES DE LA MORSURE :

Profondes	40
Superficielles	12

7^e RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES SUIVANT QUE LES VÊTEMENTS ONT ÉTÉ INTERPOSÉS OU NON :

Peau nue	38
Vêtements interposés	14

8^e RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES D'APRÈS LE SIÈGE DE LA MORSURE :

Tête	7
Membres supérieurs	25
Tronc	1
Membres inférieurs	19

9^e RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES D'APRÈS LE NOMBRE DE JOURS ÉCOULÉS ENTRE LA MORSURE ET LE TRAITEMENT :

0 à 4 jours	24
5 à 7 jours	16
8 à 14 jours	7
14 à 21 jours	5
Plus de 21 jours	0

10^e RÉPARTITION PAR DÉPARTEMENTS DES PERSONNES MORDUES EN FRANCE MÉTROPOLITAINE :

Calvados	1
Loire-Atlantique	1
Morbihan	1
Savoie	1
Seine :	1
Paris	16
Banlieue	5
Seine-et-Marne	1
Seine-et-Oise	5
Somme	1

Le tableau ci-joint indique les résultats des vaccinations antirabiques depuis la mise en application de la méthode phéniquée.

ANNÉES	PERSONNES TRAITÉES				CATÉGORIES			DÉCÈS	MORTALITÉ %
	1	2	3	4	A	B	C		
1952.....	77	—	—	77	2	1	74	0	0,00
1953.....	85	—	—	85	7	9	69	0	0,00
1954.....	80	—	—	80	5	1	74	0	0,00
1955.....	57	1	19	77	2	4	71	0	0,00
1956.....	38	4	47	89	9	0	80	0	0,00
1957.....	73	11	23	107	5	3	99	0	0,00
1958.....	92	6	6	104	10	1	93	0	0,00
1959.....	46	13	17	76	2	1	73	0	0,00
1960.....	40	0	12	52	0	0	52	0	0,00
Total général ..	588	35	124	747	42	20	685	0	0,00

1, vaccin antirabique phéniqué seul ; 2, sérum antirabique + vaccin antirabique phéniqué ; 3, sérum antirabique seul ; 4, total des personnes traitées dans l'année.

Le Service de la Rage a, en outre, fabriqué pendant l'année :
95 l de vaccin antirabique phéniqué à usage humain ;
295 l de vaccin antirabique phéniqué à usage vétérinaire.

11° MESURES PRISES EN VUE DE SUIVRE L'ÉVOLUTION DES CAS TRAITÉS PENDANT SIX MOIS AU MAXIMUM :

Les médecins sont priés de nous tenir au courant des accidents qui pourraient se produire pendant les six mois qui suivent le traitement.

12° ACCIDENTS PARALYTIQUES : néant.

13° DÉCÈS : néant.

BIBLIOGRAPHIE

[1] BÉQUIGNON (R.) et VIALAT (Ch.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 529.

[2] BÉQUIGNON (R.) et VIALAT (Ch.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **69**, 372.

**LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES
AU CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL DE TOULOUSE
EN 1960**

par G. ANDRIEU

(Centre de Vaccination Antirabique, Toulouse)

1° PERSONNES TRAITÉES : 15.

2° MÉTHODE DE TRAITEMENT : vaccin phéniqué (Fermi), sérum antirabique équin.

3° RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES D'APRÈS LE TERRITOIRE SUR LEQUEL ELLES ONT ÉTÉ MORDUES :

France	12
Tunisie	1
Côte-d'Ivoire	2

4° RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES SUIVANT L'ANIMAL MORDEUR :

Chien	13
Chat	2

5° RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES D'APRÈS LES PREUVES DE RAGE CHEZ L'ANIMAL MORDEUR :

Catégorie A	0
Catégorie B	3
Catégorie C	12

6° RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES D'APRÈS LE CARACTÈRE DE LA MORSURE :

Profondes	4
Superficielles	8
Léchage	3

7^o RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES SUIVANT QUE LES VÊTEMENTS ONT ÉTÉ INTERPOSÉS OU NON :

Peau nue	14
Vêtements interposés	1

8^o RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES D'APRÈS LE SIÈGE DE LA MORSURE :

Tête	4
Membres supérieurs	8
Tronc	1
Membres inférieurs	2

9^o RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES D'APRÈS LE NOMBRE DE JOURS ÉCOULÉS ENTRE LA MORSURE ET LE TRAITEMENT :

0 à 4 jours	9
5 à 7 jours	2
8 à 14 jours	1
15 à 21 jours	3
Plus de 21 jours	0

10^o RÉPARTITION PAR DÉPARTEMENTS DES PERSONNES MORDUES EN FRANCE MÉTROPOLITAINE :

Tarn-et-Garonne	3
Lot-et-Garonne	2
Haute-Garonne	6
Lot	1

11^o RÉPARTITION DES PERSONNES TRAITÉES SUIVANT LE TRAITEMENT APPLIQUÉ :

Vaccin antirabique seul	10
Sérum + vaccin	3
Sérum seul	2

12^o ACCIDENTS PARALYTIQUES : néant.

13^o DÉCÈS : néant.

NOTE SUR LES PLASMODES MULTINUCLÉÉS RENCONTRÉS DANS LES CULTURES CELLULAIRES INFECTÉES DE VIRUS BOVIPESTIQUE

par A. PROVOST et J.-M. VILLEMOT (*)

(avec la collaboration technique de M^{me} H. BARBERY
et de M. ASSAN OUMAR)

*(Laboratoire de Recherches vétérinaires de Farcha,
Fort-Lamy, Tchad)*

Thiéry [9] a décrit, en 1956, les plasmodes épithéliaux que l'on rencontre dans l'épithélium pavimenteux stratifié des muqueuses buccales et pharyngiennes chez les bovins atteints de peste bovine. Khéra [4], puis Plowright et MacLeod [8] ont confirmé cette observation en l'étendant aux ganglions lymphatiques.

Dans une série de publications, Plowright et Ferris [6, 7] ont décrit en détail les lésions cytologiques dues à la prolifération du virus bovípestique en cultures cellulaires de rein de veau ou de testicule bovin, lésions qui aboutissent à une destruction cellulaire laissant une trame étoilée caractéristique, suivie de la formation secondaire de plasmodes (syncytia) multinucléés ; des inclusions nucléaires acidophiles apparaissent aux derniers stades de l'infection. Il est à noter que Plowright et Ferris ont utilisé comme souche de départ le virus pestique RKBO du Kenya qui possède des caractères bien particuliers (Hammond [3]), entre autres l'absence de contagiosité et de lésions buccales chez les malades ; il semble que l'on soit en droit de le considérer à l'origine comme une souche semi-virulente. Les lésions cellulaires, visibles le cinquième ou sixième jour après l'infection, ne sont apparues avec ce virus qu'à partir du 5^e passage en culture [7] ; ce délai d'apparition s'abaisse dans les passages ultérieurs au troisième jour, l'effet cytopathogène étant complet le septième jour et ne laissant que peu de cellules normales.

(*) Manuscrit reçu le 21 mars 1961.

Une divergence de vues assez profonde se manifeste à la lecture du travail de Thiéry d'une part, et des mémoires de Khéra, de Plowright et Ferris d'autre part, quant à la formation des plasmodes multinucléés. Le premier auteur leur donne pour origine une division nucléaire anarchique : « Les cellules deviennent plus ou moins turgescentes et subissent une stimulation de reproduction intense qui aboutit à la formation de plasmodes... » Les seconds observent leur formation par la fusion de cellules mono-nucléées : « ...the individual cell membranes disappeared and the nuclei migrated into densely-packed clumps or rows » [7] (1).

C'est parce que nos observations tendent à concilier ces opinions divergentes que nous jugeons utile de publier cette note.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Nous mentionnons ici notre technique d'établissement des couches monocellulaires, car elle se révèle très simple, l'emploi de boîtes de Petri contenant des lamelles étant plus économique que celui de tubes de Leighton.

Cultures cellulaires. — Nous utilisons des cellules de rein d'embryon de veau de première explantation. Après fragmentation et digestion trypsique conduite à froid (4° C) selon les techniques ordinaires, les cellules sont mises en suspension dans un milieu au Tris-hydrolysat de caséine (selon la formule du Service des Virus de l'Institut Pasteur) enrichi de 5 p. 100 de sérum de veau originaire de France et ne contenant donc pas d'anticorps antipestiques, puis réparties dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre contenant des lamelles rondes de 22 mm. L'incubation a lieu à 36°5 sans qu'il soit besoin de faire passer un flux de carbogène dans l'étuve, le Tris tamponnant suffisamment le milieu pour assurer la stabilité du pH.

Un premier changement de milieu est effectué trois jours après l'ensemencement, les changements ultérieurs n'intervenant que tous les cinq à six jours, commandés par le virage de l'indicateur coloré.

Inoculation de virus. — Un ganglion lymphatique de zébu réagissant à l'inoculation de virus bovípestique sauvage est broyé au 1/10 dans le liquide de Hanks et centrifugé pour sédimenter les débris ; le surnageant est mélangé à raison de 1 partie pour 9 parties de suspension cellulaire juste avant la répartition en boîtes de Petri.

Coloration des lamelles. — Lorsqu'on le désire, on retire des boîtes, à la pince anatomique, des lamelles qui sont successivement plongées, sans lavage préalable, pendant trente secondes dans chacun des bains suivants : fixateur de Duboscq-Brazil, alcool absolu, alcool lithiné, eau,

(1) « ...les membranes cellulaires ont disparu et les noyaux ont migré en amas denses ou en rangées. »

hématoxyline de Harris, eau, eau bicarbonatée, éosine à 2 p. 100, eau, alcool absolu, xylène. Elles sont finalement montées au baume du Canada entre lame et lamelle.

RÉSULTATS.

En quarante-huit heures, la couche monocellulaire est formée et recouvre tout le fond de la boîte de Petri.

Dès le premier passage en culture de notre virus, des lésions cytologiques sont apparues au bout de huit jours. Ce sont tout d'abord des cellules étoilées, avec de très fins prolongements ; on les remarque plus spécialement dans les lacunes de la nappe monocellulaire. Puis apparaissent des plasmodes multinucléés. Ce sont sur eux que nous voudrions insister.

On peut, en effet, observer qu'il en existe deux types :

Le premier type (pl., fig. 1) semble être constitué d'un agrégat de noyaux, *parmi lesquels certains sont en mitose* (pl., fig. 2), rassemblés au sein d'une masse protoplasmique bulleuse, vacuolisée, très éosinophile, à contours mal définis. Les noyaux en mitose ont des caractères anormaux : la chromatine y est fragmentée en masses irrégulières. Les chromosomes peuvent parfois être rassemblés sur le plan équatorial, mais nous n'avons jamais observé la figure de télophase.

Le second type de plasmode (pl., fig. 3) semble être légèrement en retard sur le premier dans son apparition. Son aspect rappelle beaucoup celui des cellules de Langhans du follicule tuberculeux. Les noyaux sont disposés en couronne à la périphérie d'une masse protoplasmique très éosinophile, à cytoplasme peu vacuolisé. C'est dans ce type de plasmode que l'on remarque des inclusions acidophiles intranucléaires (pl., fig. 4), alors que nous n'en avons pas observé dans ceux du premier type. Ce type de plasmode semble, comme Plowright et Ferris l'écrivent, se constituer par la fusion de cellules jointives, avec disparition des membranes périphériques ; cette formation est suggérée par l'examen de la figure 5 (pl., fig. 5).

Il est à noter que cet aspect en roue devient assez rapidement confus lors du vieillissement des cultures, les plasmodes ayant tendance à fusionner les uns avec les autres au fur et à mesure qu'il s'en constitue de nouveaux.

DISCUSSION.

L'observation de l'apparition, dans les cultures cellulaires infectées de virus bovípestique, de deux types morphologiques de plasmodes multinucléés semble devoir rapprocher l'opinion

de Thiéry de celle de Plowright et Ferris. Le premier auteur a observé, dans les plasmodes présents dans l'épithélium buccal et pharyngien, des figures de mitose que nous retrouvons dans le premier type de plasmodes que nous avons décrit. Par contre, la description de Plowright et Ferris se rapporte au deuxième type syncytial à noyaux en couronne, où existent des inclusions intranucléaires. Si ces derniers auteurs ne semblent pas avoir observé de figures de mitose dans les plasmodes, ils ont, par contre, parfaitement vu la formation de deux types syncytiaux dont ils ont fait état dans leur mémoire. Nous n'attribuons qu'à la chance le fait que nos ayons pu les remarquer ; notre souche de virus sauvage, dont c'était le premier passage en culture, se développe moins rapidement que celle de Plowright et Ferris qui ont ainsi pu manquer l'observation d'un stade lésionnel particulièrement fugace.

Ces deux types morphologiques coexistent-ils dans les lésions histologiques *in vivo* ? C'est vraisemblable, ainsi que le note Khéra [4], qui observe dans les plasmodes des ganglions lymphatiques pestiques que « la disposition des noyaux est, soit périphérique, soit en forme de grappe ». Il mentionne que « les cellules géantes à disposition nucléaire périphérique proviennent de la fusion de réticulo-histiocytes ».

Notre observation étaye donc celle de Khéra. Les deux types de plasmodes doivent correspondre à deux modalités différentes de l'infection cellulaire par le virus pestique. Le premier type suggère une viciation du métabolisme nucléaire, tandis que le second rappelle les lésions de cytophagie observées en micro-cinématographie avec les virus du groupe *para-influenza III* en cultures cellulaires [1, 5].

Notre observation vient apporter de surcroît une confirmation à celle de Fastier [2] suivant laquelle des cellules infectées par un virus sont toujours capables d'une certaine activité mitotique. C'est celle que l'on observe dans les plasmodes du premier type.

RÉSUMÉ.

Les auteurs signalent l'apparition en cultures cellulaires de rein d'embryon de veau infectées de virus bovinestique de deux types de plasmodes multinucléés, qui semblent exister également dans les lésions histologiques. Leur observation apporte une nouvelle preuve de l'activité mitotique de certaines cellules infectées par un virus.

SUMMARY.

THE MULTINUCLATED PLASMODES PRESENT IN CELL-CULTURES INFECTED WITH RINDER-PEST VIRUS.

In cell cultures of calf embryo kidney infected with rinderpest virus, two types of multinucleated plasmodes appear. These plasmodes seem to exist also in histologic lesions.

These findings constitute a further evidence of the mitotic activity of certain cells infected with a virus.

REFERENCES.

- [1] CHANY (C.) et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 721.
- [2] FASTIER (L. B.). *Virology*, 1960, **10**, 542.
- [3] HAMMOND (R. A.). *Kenya Veter. Dep. annual Rep.*, 1954, 26.
- [4] KHERA (K. S.). *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1958, **11**, 398.
- [5] LÉPINE (P.), CHANY (C.), DROZ (B.) et ROBBE-FOSSET (F.). *Annals New York Acad. Sci.*, 1959, **81**, 62.
- [6] PLOWRIGHT (W.) and FERRIS (R. D.). *Nature*, 1957, **179**, 316.
- [7] PLOWRIGHT (W.) and FERRIS (R. D.). *J. comp. Path.*, 1959, **69**, 152.
- [8] PLOWRIGHT (W.) and MACLEOD (W. G.). *E. A. V. R. O. Annual Rep.*, 1956-57, 56.
- [9] THIÉRY (G.). *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1956, **9**, 117.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

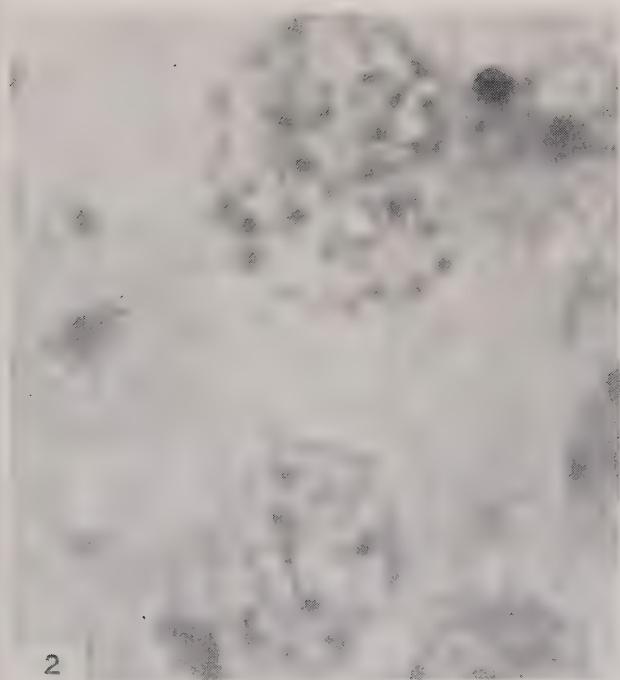
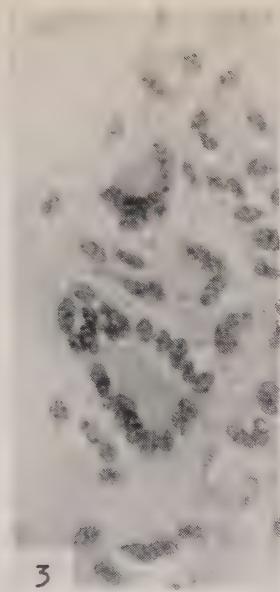
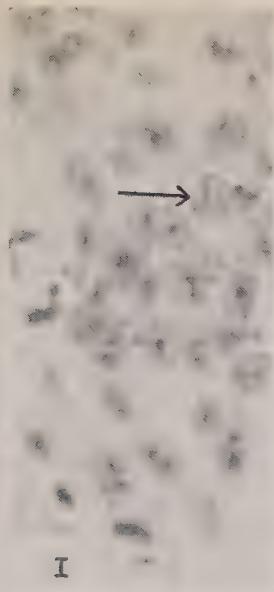
FIG. 1. — Plasmode multinucléé de type 1. Culture cellulaire de rein d'embryon de veau âgée de 3 jours, infectée de virus bovipestique à l'ensemencement. Noter deux noyaux au stade final de la prophase. Hémat.-éos. Gr. 128.

FIG. 2. — Même figure que la fig. 1. Gr. 800. On distingue dans deux noyaux les masses chromosomiques.

FIG. 3. — Plasmode multinucléé de type 2 à noyaux en couronne. Culture cellulaire de rein d'embryon de veau âgée de 15 jours, infectée de virus bovipestique à l'ensemencement. Hémat.-éos. Gr. 128.

FIG. 4. — Inclusion intranucléaire entourée d'un halo. Même culture que celle de la figure 3. Hémat.-éos. Gr. 800.

FIG. 5. — Plasmode de type 2 en formation. Même figure que celle de la figure 4. Noter le début de la fusion cytoplasmique. Hémat.-éos. Gr. 128.



SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE
(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e)

Séance du 1^{er} juin 1961.

Présidence de M. Robert FASQUELLE.

COMMUNICATIONS

**FIXATION COMPARÉE DE DIFFÉRENTS ÉCHANTILLONS
DE RADIOPHOSPHORE PAR LES BACTÉRIES**

par Antonina GUELIN et Pierre LÉPINE.

(Institut Pasteur)

Les résultats très variés obtenus dans nos expériences de fixation du radiophosphore sur les bactéries chauffées ont été rapportés dans notre précédent travail [1], le niveau de fixation pouvant atteindre, dans certains cas, celui qui a été observé chez les germes en croissance.

La comparaison simultanée de quelques échantillons de ^{32}P nous a permis de constater la différence de leur comportement au cours de la fixation sur les bactéries chauffées. Cette différence peut être à l'origine des variations constatées précédemment dans la fixation du phosphore radioactif.

MATÉRIEL ET MÉTHODE. — La souche de *Shigella paradyENTERIAE* Y6R a été utilisée pour les expériences. Comme milieu de croissance, nous nous sommes servis de peptone à 1/1 000, à pH 7,5, additionnée ou non de radiophosphore et répartie en tubes de 22 mm, à raison de 10 ml par tube. La fixation du radiophosphore sur les germes chauffés s'effectuait pendant une heure à 48° C.

Les sept échantillons d'acide phosphorique marqué (^{32}P), préparés dans le Service des Radioéléments Artificiels, au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, nous ont été livrés de janvier à avril 1960. Leur analyse chimique et spectrale, faite à Saclay, n'indiquait rien de particulier. La chromatographie réalisée par le groupe de contrôle de Saclay, afin de mettre en évidence les polyphosphates a donné, pour tous les échantillons, des résul-

tats inférieurs à 0,5 p. 100. Cependant, leur intensité de fixation sur les germes non viables a été très différente.

La substance radioactive, neutralisée par la solution de lessive de soude à 1/20, a été introduite dans le milieu de culture à la dose de 2 à 7 microcuries/ml. Les détails techniques sont exposés dans le travail précédent [1].

RÉSULTATS. — L'intensité de la fixation sur les bactéries chauffées des différents échantillons de ^{32}P est très inégale ; elle peut varier dans la proportion de 1 à 100 (tableau I), ce qui n'est pas le cas pour les mêmes

TABLEAU I.

RADIOPHOSPHORE (^{32}P)		FIXATION SUR LES BACTERIES (μc)		RAPPORT DE FIXATION (en croissance chauffées)
Date de livraison	Radioactivité spécifique (mc)	En croissance	Chaussées	
5 janv. 1960	6,2	0,2	0,2	1/1
2 févr. 1960	23,9	0,2	0,03	1/7
1 ^{er} mars 1960	34,0	0,2	0,002	1/100

germes au cours de leur multiplication en présence de cet élément. Les résultats présentés dans ce tableau ont été obtenus le même jour avec trois échantillons de radiophosphore, choisis parmi les plus caractéristiques de la série étudiée, en ce qui concerne leur fixation.

Il ne faudrait pas croire que la différence de radioactivité spécifique des échantillons de ^{32}P intervienne dans nos expériences, au moins de façon décisive : les résultats exposés dans le tableau II montrent, en

TABLEAU II.

RADIOPHOSPHORE (^{32}P)		RAPPORT DE FIXATION (en croissance chauffées)
Date de livraison	Radioactivité spécifique (mc)	
6 janvier 1959	9,0	1/1
7 avril 1959	10,0	1/200
2 février 1960	23,9	1/7
1 ^{er} mars 1960	34,0	1/100

effet, que l'intensité de la fixation est indépendante de la radioactivité spécifique de ^{32}P utilisé.

En ce qui concerne la différence de l'âge des échantillons au moment de leur utilisation, nous avons pu conclure qu'au cours de la désintégration du phosphore radioactif chaque échantillon garde à peu près la même intensité de fixation sur les bactéries chauffées. Les résultats

TABLEAU III.

Date de livraison	Radioactivité spécifique (mc)	Age de ^{32}P (en jours)						MOYENNE DE FIXATION DE ^{32}P	RAPPORT DE FIXATION (en croissance chaufées)
		7	21	28	35	49	56		
5 janv. 1960	6,2	0,6 0,8	— 0,8	0,3 0,2	— 0,4	0,3 0,4	0,2 0,2	0,6 0,6	1/1
2 fév. 1960	23,9	0,3 0,04	0,4 0,1	0,2 0,02	— —	0,8 0,15	— —	0,4 0,08	1/7
12 fév. 1960	34,8	0,3 0,06	0,1 0,04	— —	0,8 0,15	0,6 0,01	— 0,01	0,5 0,06	1/8
1 ^{er} mars 1960	34,0	0,2 0,004	0,2 0,002	— —	0,7 0,003	— —	— 0,001	0,4 0,003	1/100

Les chiffres au-dessus du trait indiquent les bactéries en croissance.
Les chiffres au-dessous du trait indiquent les bactéries chauffées.

présentés dans le tableau III indiquent une certaine continuité du comportement de chaque échantillon dans les limites de temps étudiées.

Il semble bien que la différence observée dans la fixation de ^{32}P par les bactéries peut être attribuée aux échantillons utilisés, bien qu'il soit encore impossible d'en connaître la cause. Les résultats obtenus confirment la possibilité d'une fixation, intense et non métabolique, du phosphore par les bactéries non viables. On peut se demander si une telle fixation n'a pas également lieu dans les cas des bactéries en croissance, en dehors du phénomène de l'assimilation.

RÉSUMÉ. — Une étude comparée de différents échantillons de radio-phosphore a été faite au cours d'expériences portant sur leur fixation par les bactéries vivantes ou chauffées.

Dans les conditions de l'expérience, la fixation de ^{32}P sur les bactéries non viables a présenté des variations importantes en fonction de l'échantillon utilisé.

Les variations de fixation paraissent indépendantes de la radioactivité spécifique des échantillons utilisés et de l'état de leur désintégration.

SUMMARY

COMPARATIVE FIXATION OF VARIOUS RADIOACTIVE PHOSPHOROUS SAMPLES BY BACTERIA.

Comparative study of the fixation of various radioactive phosphorous samples on living and heat-killed bacteria.

In the conditions of the experiments, the fixation of ^{32}P on killed bacteria varied greatly according to the sample used.

The differences in the fixation seem to be independant of the specific radioactivity of the samples used and of their disintegration stage.

BIBLIOGRAPHIE

[1] GUELIN (A.) et LÉPINE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 242.

**RALENTISSEMENT DE L'ÉVOLUTION
DES RADIOLÉSIONS CUTANÉES
CONSÉCUTIVEMENT A UN POST-TRAITEMENT
AVEC L'HYALURONIDASE**

par J. LOISELEUR.

(Institut Pasteur, Service de Chimie-Physique) *

L'expérience établit une relation étroite entre la radiosensibilité du tissu conjonctif et l'activité de son métabolisme. Il en résulte la possibilité de réduire, par un post-traitement avec l'hyaluronidase, l'évolution des radiolésions cutanées.

L'irradiation de la peau des petits mammifères manifeste ses effets après une latence de plusieurs jours. Par exemple, l'administration de 3 500 r sur la peau du rat entraîne, vers le douzième jour, la chute du poil ; la peau prend un aspect humide et la radiodermite apparaît rapidement vers les quatorzième et quinzième jours.

Or, l'expérience montre que cette latence dépend de l'activité du tissu conjonctif et peut être modifiée par la simple intervention de l'hyaluronidase ou de son sérum antagoniste. L'effet de ces traitements sur la radiosensibilité devient évidente quand on compare leurs effets inverses selon qu'ils interviennent avant ou après l'irradiation.

1^o Prétraitement par l'hyaluronidase. — Des rats, d'un poids moyen de 150 g, ne subissent aucun traitement et servent de témoins. Un autre groupe reçoit, pendant quatre jours, l'injection sous-cutanée de 30 unités d'hyaluronidase. Dès la fin du traitement, on administre, à tous ces animaux, sur une zone circulaire (diamètre, 2 cm) prélevée dans la région dorso-lombaire, une dose de 3 500 r (1) [tube Holweck, 37,5 kV, 15 mA, distance anticathode/peau = 17 cm, filtration par 0,05 mm Al], le reste de l'animal étant protégé par une feuille de plomb.

Les animaux traités par l'hyaluronidase manifestent leurs radiolésions avec une avance très notable : la chute du poil commence dès le dixième jour. Le quatorzième jour, tous ces animaux présentent une radiodermite avec élimination totale du cercle de peau irradié, élimination comparable à une ablation par un emporte-pièce. A la même date, les témoins, irradiés mais non traités, présentent seulement le début de l'épilation.

L'expérience établit ainsi une interdépendance rigoureuse entre l'activation du métabolisme et l'augmentation de la radiosensibilité.

2^o Prétraitement par le sérum anti-hyaluronidase. — L'expérience conduit maintenant à un résultat opposé au précédent : le ralentissement du métabolisme consécutif à l'action du sérum entraîne une diminution remarquable de la radiosensibilité.

Les animaux reçoivent, la veille de l'irradiation, l'injection de 1 ml de sérum et subissent la même irradiation que précédemment : la chute du poil commence à se manifester seulement vers les quinzième et seizième jours, et les radio-nécroses ne débutent qu'à partir du vingt et unième jour.

3^o Post-traitement par l'hyaluronidase. — Les phénomènes sont diamétralement opposés si l'on applique maintenant ces traitements comme curatifs, c'est-à-dire après l'irradiation. L'hyaluronidase va accélérer le métabolisme et, en même temps, la réparation des radiolésions ; son action se traduit par l'observation d'un retard dans la chute du poil et dans l'apparition des radiodermites. L'observation de ce retard à la suite d'un traitement curatif montre qu'il est possible d'agir sur des radiolésions en cours d'évolution. L'hyaluronidase est injectée à doses répétées pendant plusieurs jours et en quantités décroissantes. Immédiatement après l'irradiation, les animaux reçoivent 10 unités de l'enzyme ; le deuxième jour, l'injection ne comporte que 9 unités et l'on continue, pendant dix jours, en diminuant de 1 unité par jour la dose de l'hyaluronidase. Ces animaux présentent, tous, un retard manifeste par rapport aux témoins irradiés dans les mêmes conditions, mais non traités : l'épilation est totale chez les témoins le quatorzième jour, tandis que pour les animaux traités, la chute du

(1) La dose la plus favorable pour cette expérimentation semble située entre 3 000 et 4 000 r. Une dose plus faible entraîne une plus grande prolongation de la latence entre l'irradiation et l'observation de ses effets. Inversement, pour une dose plus élevée et supérieure à 6 000 r, la succession des étapes de la radiolésion est trop rapide.

poil n'a pas encore débuté. Un décalage analogue s'observe pour la manifestation des nécroses.

4^e Post-traitement par le sérum anti-hyaluronidase. — Par son action freinatrice sur le métabolisme, ce sérum ralentit la réparation et accélère ainsi les manifestations de l'irradiation. Immédiatement après l'irradiation et pendant une durée de dix jours, les animaux reçoivent une injection de doses de sérum croissant de 0,1 à 1 ml : dès le dixième jour, la chute du poil apparaît. Les radio-nécroses apparaissent aussi avec une avance sur les témoins.

DISCUSSION. — Tous ces résultats sont groupés dans le tableau I.

TABLEAU I.

Action exercée sur la manifestation des irradiations.

	HYALURONIDASE	SÉRUM ANTI-HYALURONIDASE
Prétraitement	—	—
Post-traitement	Accélération Retard	Retard Accélération

La figure 1 donne une reproduction sensiblement fidèle des quatre expériences précédentes. Pour chacune, le cercle représente la zone irradiée. Vers le douzième jour (pour les témoins), le début et l'état de la chute du poil sont figurés par des petits traits. On assiste alors au développement des radiodermites (cercles de plus en plus ombragés).

La concordance de ces résultats établit d'une façon très nette l'influence des variations du métabolisme conjonctif sur la radiosensibilité cutanée, et précisément dans la mesure où les agents expérimentés agissent sur le métabolisme.

En effet, l'importance de ces actions peut être évaluée très simplement. Par exemple, si la chute du poil apparaît chez le témoin vers le douzième jour et si le traitement préventif par l'hyaluronidase provoque une avance de deux jours, l'activation de la radiosensibilité prend ici la valeur de 20 p. 100. On arrive, pour les autres expériences, à une évaluation sensiblement voisine, comprise entre 20 et 25 p. 100. On retrouve ici, un ordre de grandeur superposable à celui de l'action de ces agents sur la diffusion intradermique du bleu trypan (augmentation de 30 p. 100 par l'hyaluronidase, diminution de 20 p. 100 par le sérum antagoniste).

Il est intéressant de comparer maintenant ces expériences avec celles qui font intervenir la privation d'oxygène, l'augmentation des métabolites ou la diminution du métabolisme, en considérant les seules expériences relatives à la radiosensibilité cutanée.

Pour l'oxygène, son activation par le rayonnement lui permet de léser toute molécule, banale ou importante, placée dans son rayon d'action. Lacassagne [3] a obtenu une protection totale en maintenant

en anoxie le souriceau nouveau-né ; l'irradiation n'apporte alors aucune perturbation dans le développement ultérieur du poil, tandis que les témoins, irradiés dans les conditions normales de respiration, restent glabres.

Pour les métabolites, leur concentration augmente le nombre des radio-récepteurs indifférents au bénéfice des organites essentiels qui se trouvent ainsi protégés. Il suffit d'amener le lapin en hyperglycémie, pour diminuer les radiolésions cutanées (Baclesse et Loiseleur [1]).

Il en est de même pour les traitements qui entraînent le blocage du métabolisme, tels que la narcose ou l'hypothermie (Evans et coll. [2]).

Enfin tout récemment, Radivojic, Beaumariage et Bacq [4] ont montré

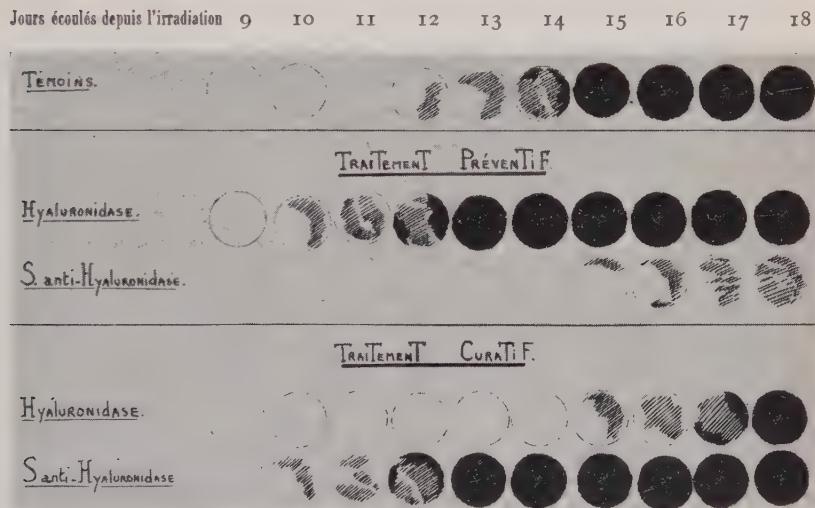


FIG. 1. — Cercles blancs = zone irradiée. Cercles hachurés = chute du poil. Cercles noirs = radiodermite.

qu'une injection sous-cutanée de cystéamine inhibe localement l'épilation du souriceau par les rayons X.

Au contraire, dans des expériences précédentes, la modification du métabolisme reste partielle, ce qui explique que le traitement n'entraîne pas la disparition des radiolésions, mais seulement leur décalage dans le temps.

RÉSUMÉ. — La radiosensibilité cutanée est liée à l'activité du tissu conjonctif. Elle est diminuée par un traitement préventif avec le sérum anti-hyaluronidase. Après l'irradiation, l'injection directe de l'enzyme retarde l'apparition des radiolésions.

SUMMARY

SLOWING DOWN OF THE EVOLUTION OF SKIN RADIOLÉSIONS
FOLLOWING A POST-TREATMENT WITH HYALURONIDASE.

Skin radiosensitivity is linked to the activity of connective tissue. It is decreased by a preventive treatment with an anti-hyaluronidase serum. After irradiation, the direct injection of the enzyme delays the appearance of the radiolesions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BACLESSE (F.) et LOISELEUR (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 1160.
- [2] EVANS, ROBBIE, GOODRICH and SLAUGHTER. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1941, **46**, 1217.
- [3] LACASSAGNE (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1942, **215**, 231.
- [4] RADIVOJIC, BEAUMARIAGE et BACQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1960, **154**, 422.

TOXOPLASMOSE DU FŒTUS DE LA SOURIS GESTANTE

par G. SERGENT et G. VIAL.

(Institut Pasteur, Service de la Rage)

L'importance de la voie vasculaire dans la diffusion de la parasitose apparaît prédominante dans la pathogénie des manifestations congénitales de la toxoplasmose humaine, qui furent parmi les premières reconnues et décrites (Wolf et coll. [5]).

Il était logique, mais certes prématué, de prévoir que le domaine de la parasitose allait s'étendre bientôt à toute une pathologie encore inexplorée de divers appareils de l'organisme humain (Béquignon et Sergent [4]).

La connaissance de la morphologie des formes mineures, corpusculaires, de *Toxoplasma gondii* (Béquignon et coll. [3]) peut y contribuer.

En tout cas, les manifestations cliniques et expérimentales de la toxoplasmose ne manquent pas dans la pathologie animale. Nous avons signalé incidemment (Béquignon et coll. [3]) la parasitose fœtale chez le chien, au cours de la forme nerveuse.

Au cours de recherches expérimentales sur la transmission de la toxoplasmose humaine à la souris, transmission qui paraît à ce jour une des méthodes les plus efficaces et les plus fidèles, nous avons pu prélever un fœtus de 0,7 cm environ, que l'étude histologique montra parasité par *Toxoplasma gondii*. Il s'agit d'un fœtus découvert et prélevé à l'autopsie systématique de la souris 1480 (deuxième passage effectué

le 14 novembre avec le sang total de M. R. Ra...), sacrifiée le 21 novembre, soit sept jours après l'inoculation (fig. 1).

On aperçoit aussitôt, dans la couche superficielle de l'ectoderme, et dans le mésoderme qui entoure les diverses ébauches d'organes embryonnaires, un certain nombre de cellules (environ une sur dix) qui ont doublé de volume. Ces cellules sont remplies d'une sorte de liquide

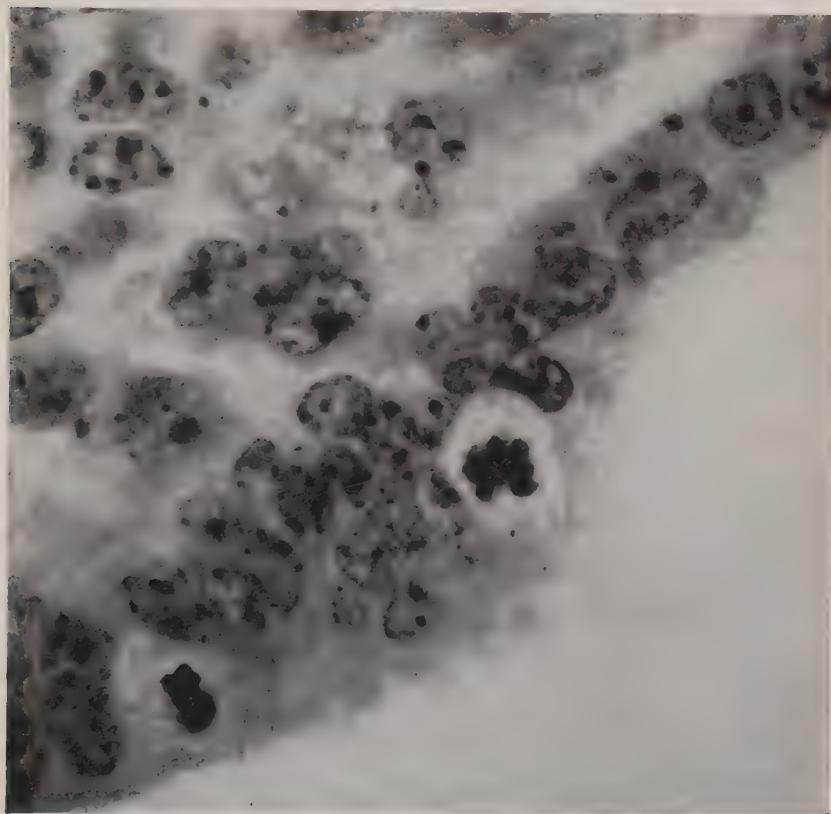


FIG. 2. — Kystes toxoplasmiques développés aux dépens de cellules de l'embryon.
Kystes dans le revêtement ectodermique.

aux lieu et place du protoplasme, avec un agglomérat central hyperchromatique de toxoplasmes qui, développés à l'intérieur de la cellule, sans rompre la membrane cellulaire, l'ont transformée en un véritable pseudo-kyste. Il n'existe aucune réaction inflammatoire du tissu, et il s'agit en somme d'une culture pure, sur embryon, avec multiplication du protozoaire dans un tissu en pleine activité, comme l'avaient montré en cultures de tissus *in vitro*, Chernin et Weller [4] en 1954, pour le protozoaire adulte.

Or, ici, le protozoaire n'a pas été inoculé à la mère et n'existe chez elle que sous forme mineure, corpusculaire, ainsi que le montrent les coupes de l'encéphale.

On pourrait déduire de ces faits un certain nombre de conclusions sur l'absence de transmission d'anticorps de la mère au fœtus, ou sur la présence d'un facteur de croissance chez le fœtus. Ils prouvent en tout cas que le fœtus de l'animal parasité naturellement ou expérimentalement par *Toxoplasma gondii* est lui-même parasité, comme il est logique au cours d'une parasitose sanguine et avant tout vasculaire.

SUMMARY

TOXOPLASMOSIS IN FŒTUS OF PREGNANT MICE.

The fœtus of naturally or experimentally infected mice contains *Toxoplasma gondii* and constitutes an excellent culture medium for the parasite.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BÉQUIGNON (R.) et SERGENT (G.). *Bull. Acad. Méd.*, 1955, **33**, 536.
- [2] BÉQUIGNON (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1360.
- [3] BÉQUIGNON (R.), SERGENT (G.) et VIALAT (Ch.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 702.
- [4] CHERNIN (E.) and WELLER (T.). *Proceed. Soc. exp. Biol.*, 1954, **85**, 68.

CALCIFICATIONS DE LA TOXOPLASMOSE, HUMAINE ET ANIMALE

par G. VIAL, G. SERGENT et R. BÉQUIGNON.

(*Institut Pasteur, Service de la Rage*)

De même que, par un singulier hasard, la connaissance de la toxoplasmose doit beaucoup aux observations faites en médecine infantile, de même, c'est aux examens radiologiques systématiquement effectués sur les crânes des enfants déficients suspects d'une telle parasitose, que l'on doit la connaissance des calcifications intracraniennes, qui signent et assurent parfois, le diagnostic porté.

Or, jamais, à notre connaissance, de telles lésions n'ont été signalées dans le règne animal, où la parasitose est si fréquente. A vrai dire, les examens radiologiques du crâne sont assez malaisés chez l'animal. Ils sont également peu courants et demanderaient des installations importantes, surtout s'il s'agit d'animaux de grande taille.

Cependant, la calcification est une évolution normale, et peut-être précoce, des lésions toxoplasmiques chez l'animal comme chez l'homme, non seulement dans le tissu nerveux, mais aussi dans les tissus musculaires.

Et il nous a été loisible, à maintes reprises, de mettre en évidence la transformation calcique de foyers de toxoplasmose chronique tant chez l'homme que chez l'animal, par l'examen histologique des pièces. Il suffit en effet d'user d'une coloration cytochimique spéciale, mais bien connue, celle décrite par Kossa [2] par exemple.

Il est fréquent, au cours des lectures de coupes histologiques de névraxes de chien ou de chat, colorées avec la méthode de Mann, de constater les modifications de la coloration habituelle des amas toxoplasmiques. Alors que, sur la même coupe, beaucoup d'amas corpusculaires apparaissent avec la basophilie hyperchromatique accoutumée, la coloration d'un certain nombre d'amas voisins et morphologiquement très semblables apparaît plus grise, presque noire, en tous cas plus sombre et moins brillante. Le fait semble plus fréquent chez les animaux âgés dont l'histoire clinique évoque à n'en pas douter une longue parasitose, mais on l'observe aussi bien chez des animaux ayant succombé à une forme clinique aiguë et en apparence récente. Sur ces coupes, la coloration histochimique élective du calcium précise sans ambiguïté la « calcification » du toxoplasme.

Et la même constatation a été faite sur des encéphales de bovins jeunes ayant succombé à une encéphalite toxoplasmique.

En l'absence de modifications apparentes de la coloration de Mann, la coloration de Kossa met en évidence la calcification du toxoplasme dans les tissus humains. A défaut de tissu nerveux, il nous a été possible de l'effectuer sur des coupes de derme et de fibrome utérin (obtenus par exérèse). Alors que la coloration de Mann permet aisément l'identification — pour nous, classique — du protozoaire, la coloration de Kossa prouve la calcification du germe, dans le tissu musculaire aussi bien que dans le derme.

Il convenait, dès lors, de s'assurer, par l'histologie, que la calcification macroscopique ou microscopique est une évolution normale de la toxoplasmose et des développements que comporte éventuellement le fait.

Il convient, tout d'abord, d'envisager les résultats de la coloration de Kossa sur les étalements du protozoaire tel qu'on peut l'étudier dans l'ascite péritonéale de souris : cette coloration ne permet pas de déceler un seul dépôt calcique dans le protozoaire, parfaitement développé, et qui ne se colore que par le carmin, alors que les quelques grains calcaires ne se voient qu'aux alentours des rares cellules endothéliales présentes dans le liquide ascitique.

Par contre, si on s'adresse aux protozoaires qui se multiplient aux dépens des cellules ecto et endodermiques du fœtus de la souris gestante parasitée, à l'intérieur de véritables pseudo-kystes, l'histochimie montre une teneur calcique élevée, avant le huitième jour. Et la parasitose se développe en l'absence rigoureuse de toute manifestation inflammatoire de tissu. On peut seulement noter, à l'intérieur de la cellule bordante transformée en pseudo-kyste, l'abondance d'un liquide protoplasmique,

fibrineux et sans doute de nature muco-protéinique, qu'il est tentant de rapprocher des muco-protéines intervenant, pour Godard [1], dans l'ostéogénèse normale.

Il apparaît difficile de s'en tenir aux théories classiques sur le mécanisme et la pathogénie des « calcifications intracraniennes » : celles-ci (Paillas et coll. [3]) « se produisent chaque fois qu'un processus de prolifération cellulaire, qu'une dégénérescence ou une nécrose, sont susceptibles de bouleverser les conditions physiologiques locales » (?) et il semble nécessaire de revoir, à la lumière de données plus actuelles, les classifications encore admises, sur les diverses calcifications intracraniennes révélées par la radiologie et rapportées à l'ossification de tumeurs, à la dégénérescence ou à la nécrose (où sont rangées les calcifications observées au cours de la toxoplasmose cérébrale), à une origine vasculaire (?) enfin, où il ne « s'agirait plus de dépôts athéromateux, mais d'une calcinose », laquelle marque trois affections spéciales : l'angiomatose encéphalo-trigéminalée, le syndrome de Geyelin-Penfield, et la maladie de Fahr (Paillas et coll. [3]).

Et à la réflexion, il y aurait peut-être intérêt à préciser le rôle de la toxoplasmose dans des dépôts athéromateux et dans leur multiple pathologie, si diversement comprise. Si on se reporte aux constatations de G. Vial et J. Lacapère en matière de rhumatologie, on pourrait envisager sans crainte une certaine synthèse, nouvelle certes, mais bien satisfaisante.

SUMMARY

CALCIFICATIONS IN HUMAN AND ANIMAL TOXOPLASMOSIS.

Calcification is a normal evolution of toxoplasmic lesions, in man and animals, not only in nervous tissues, but also in other tissues.

BIBLIOGRAPHIE

[1] GODARD (H.). *Thèse de Sciences*, Paris, 1951.

[2] In LISON (L.). *Histo chimie*, Paris, 1953.

[3] PAILLAS (J.-E.), LÈGRE (J.) et MASSAD (A.). *Presse méd.*, 1957, 65, 768.

Les communications suivantes paraîtront en Mémoire dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

La technique des répliques et l'observation directe des éléments fongiques de la rhizosphère, par R. MOREAU et A. VAN EFFENTERRE.

Extraction de l'antigène H des salmonelles sous forme soluble, par M^{me} J. GRABAR et M. YOMTOV.

Essai d'interprétation de certaines défaillances de la réaction de fixation du complément dans la poliomyélite au moyen de la réaction d'inhibition de la fixation du complément, par Cl. CHASTEL et M^{me} J. VIRAT.

Conversion de cultures de *S. schwarzengrund* et *S. bredeney* dépourvues de l'antigène 27 en cultures 27 positives par la lysogénisation, par L. LE MINOR, M^{me} S. LE MINOR et P. NICOLLE.

Recherches sur l'individualisation sérologique des staphylo-coques. Mise en évidence de deux nouveaux agglutinogènes spécifiques, par J. PILLET, B. ORTA et M. PERRIER.

Etudes sur l'hypo-γ-globulinémie des animaux sans germe (germ free), par E. SACQUET et R. VARGUES.

A propos de l'absence de taches de tyrosine sur les chromatogrammes des hydrolysats acides des anatoxines, par M^{me} J. BLASS.

LIVRES REÇUS

R. Pollitzer. — *Le choléra*. 1 vol. in-8°, 1 065 p., 22 fig., Organisation Mondiale de la Santé, Série de Monographies n° 43, Genève, 1960. Prix relié : 60 fr. s.

Cet ouvrage, publié en deux versions, française et anglaise, reproduit en les complétant quelque peu les *Etudes sur le choléra* parues dans le Bulletin de l'O. M. S. de 1954 à 1957. L'auteur, à qui nous sommes déjà redevables de l'excellente monographie *La peste*, éditée dans la même collection, a passé en revue chacun des innombrables travaux scientifiques consacrés au choléra et en a donné l'analyse avec une compétence et une impartialité remarquables. L'ouvrage est divisé en onze chapitres, traitant chacun d'un aspect particulier du problème du choléra et suivis chacun d'une bibliographie parfaitement exhaustive.

Le premier chapitre, consacré à l'historique de la maladie, de l'antiquité à 1923, relève les premiers témoignages de l'origine du choléra et retrace le cours des « grandes pandémies » qui, au XIX^e siècle, ont répandu le choléra dans le monde au point « qu'il est plus facile de signaler les rares zones épargnées par le fléau que d'énumérer les nombreux pays atteints ». Dans le deuxième chapitre, « Fréquence mondiale », figurent tous les renseignements statistiques désirables sur tous les cas de choléra endémiques et épidémiques de 1923 à 1958. Les chapitres suivants, « Bactériologie, Immunologie, Bactériophages », analysent particulièrement les recherches faites en laboratoire. Le suivant, « Diagnostic », leur apporte une conclusion pratique. Viennent ensuite deux chapitres consacrés à l'étude clinique de la maladie et à son traitement, tandis que les deux derniers traitent de l'épidémiologie, de la prophylaxie et de la lutte contre le choléra. En annexe, on trouve des instructions précises sur l'examen des fèces suspectes et l'isolement de *Vibrio cholerae*. Vingt-deux figures seulement accompagnent le texte qui eût gagné à être mieux illustré.

Cet ouvrage, qui constitue au premier chef un instrument de travail indispensable aux spécialistes, présente aussi un intérêt certain pour tous les médecins, car l'intérêt du choléra n'est pas seulement rétrospectif mais toujours actuel : la maladie persiste toujours dans les zones endémiques et (c'est la conclusion de l'auteur) « si les risques d'expansion ont progressivement diminué, on doit se garder d'un optimisme excessif et craindre que le choléra ne devienne une fois de plus une menace grave ».

J. G.

H. J. Parish et D. A. Cannon. — *Antisera, toxoids, vaccines and tuberculins in prophylaxis and treatment.* 5^e édit., 1 vol., 288 p., E. et S. Livingstone, édit., Edimbourg et Londres, 1961. Prix : 37 s. 6 d.

Le but de ce livre, dont la première édition date de 1948, est de « présenter les principes essentiels de l'immunologie et leur application pratique à la médecine humaine ». Il s'adresse au praticien de médecine générale et aux médecins hygiénistes. Les principes de préparation, les modes d'administration des vaccins et sérum sont présentés clairement, avec quelques références bibliographiques importantes. Dans le dernier chapitre sont traités, toujours au point de vue de la pratique médicale courante, les problèmes des vaccinations combinées, des calendriers des vaccinations des enfants, des immunisations pour les voyages à l'étranger, des méthodes pratiques pour reconnaître qu'un individu a été vacciné.

Ce livre se termine par un historique relatif aux divers vaccins à usage humain.

L. L.

P. Lépine. — *Les virus.* 1 vol., 123 p., Collection « Que sais-je ? », Presses Universitaires de France, Paris, 1961.

Ce petit livre, comme tous ceux de cette collection, s'adresse à un public averti mais non spécialisé, et le met rapidement et clairement au courant des toutes dernières acquisitions dans le domaine des virus : les caractères qui les différencient des autres agents infectieux, leur mode de reproduction, et enfin leur nature, toutes questions d'un intérêt capital et sur lesquelles les connaissances ont fait en quelques années des progrès extrêmement rapides. La découverte du rôle des acides nucléiques dans la virulence et les expériences qui ont permis de les séparer, puis de les dégrader en plusieurs centaines de composants, eux-mêmes dépourvus de virulence, cette virulence pouvant être récupérée lorsque les composants dissociés sont de nouveau réunis, ont démontré que l'acide nucléique est à la fois le constituant responsable de l'infectiosité et le porteur de l'information génétique. Le mode de reproduction des virus et des bactériophages est très particulier ; la participation de la cellule-hôte et du milieu à la replication des particules virulentes prouve que le mécanisme est entièrement différent de celui de la reproduction des bactéries. L'existence du prophage transmis héréditairement par la bactérie à sa descendance, comme celle du virus sigma de la Drosophile, rapproche étroitement virus et gènes. Le problème des rapports entre virus et cancer est éga-

lement étudié et les expériences récentes sur les tumeurs à virus connues chez les animaux et les interactions entre le virus et le milieu où il se développe montrent la complexité de la question. Enfin, l'auteur envisage le problème de la nature « vivante » des virus, qui s'est posé surtout depuis les expériences de cristallisation de Stanley. En réalité, les virus ne peuvent être rattachés à aucune structure biologique ; ils ne constituent pas un intermédiaire entre matière vivante et matière inanimée ; ils sont virus et c'est tout.

H. T.

Ciba Foundation Study group n° 6. Metabolic effects of adrenal hormones. 1 vol., 109 p., J. et A. Churchill édit., Londres, 1960.

Comme les précédents, ce petit livre contient des articles rédigés par différents auteurs sur la cortisone et les composés voisins, sur le métabolisme des glucides et des protéines, le rôle des stéroïdes surrénaux dans la régulation du métabolisme hépatique, celui des hormones de la surrénale dans la synthèse des protéines *in vitro*, les effets de ces hormones sur les tissus adipeux, etc. La réunion s'est terminée par une discussion générale. L'ensemble constitue une brève mise au point de la question.

H. T.

W. Graumann et K. Neumann. — *Handbuch der Histochemie.* Vol. VII/I. *Enzyme.* Erster Teil. *Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1960. Prix : 65 DM.

Cette monographie de plus de 200 pages contient la majorité des techniques de localisation histochimique des enzymes. La compétence des auteurs est garante de la qualité du choix des différentes techniques. Les différentes enzymes suivantes sont passées en revue : oxydoréductase, déshydrogénase, estérase, sulfatase, phosphatase, peptidase, uréase, glycosidase et transférase. Une bibliographie de 30 pages, ainsi qu'un index des matières de près de 20 pages, complètent ce nouveau volume du Traité d'Histo chimie de Graumann et Neumann.

A. E.

Ciba Foundation Symposium on adrenergic mechanism. 1 vol., 632 p., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1960. Prix : 70 s.

Comme pour les volumes précédents, il s'agit des communications présentées à ce nouveau Symposium, qui réunissait des membres de la British Pharmacological Society, de la Biochemical Society et de la Royal Society of Medicine. Ces communications ont été groupées sous 10 rubriques qui envisagent successivement les différents aspects de la question, et qui comportent une bibliographie et une discussion.

H. T.

S. K. Kon et A. T. Cowie. — *Milk : the mammary gland and its secretion.* 2 vol., 515 et 420 p., Academic Press, New York, 1961. Prix : 14 \$ et 12 \$.

A. Szent-Gyorgyi. — *Introduction to a submolecular biology,* 1 vol., 135 p., Academic Press, New York et Londres, 1960.

Jean Brachet et Alfred E. Mirsky. — *The cell. Biochemistry, physiology, morphology.* Vol. V : Specialized cells : Part. 2. Academic Press, New York et Londres, 1961. Prix : 20 \$.

Le cinquième volume de ce traité de cytologie est, comme les différents ouvrages produits par cet éditeur, d'une excellente présentation. Les différents chapitres traités concernent les cellules glandulaires, les cellules rénales, les cellules sanguines et l'hématopoïèse par M. BESSIS, les os et le cartilage par P. LACROIX, la peau par W. MONTAGNA, la formation des anticorps par P. D. McMMASTER, les cellules cancéreuses par OBERLING et BERNHARD, la biochimie des cellules cancéreuses par LE BRETON et Y. MOULLÉ. Chacun de ces chapitres a donc été traité par un spécialiste qualifié et, chose assez inhabituelle, la majorité d'entre eux sont des chercheurs de langue française. L'iconographie témoigne des progrès effectués récemment dans chacune de ces branches. Un index des matières de près de 25 pages complète l'ouvrage, ainsi qu'un index des auteurs de même importance. Ce traité sera donc aussi apprécié des spécialistes que de tous ceux qui s'intéressent à la biologie.

A. E.

R. J. C. Harr's. — *Protein biosynthesis.* 1 vol., 409 p. Academic Press, Londres et New York, 1961, Prix : 95 s.

Cet ouvrage reproduit l'ensemble des exposés et discussions du Symposium International qui s'est tenu à Wassenaar en Hollande, fin août 1960, sur le problème de la biosynthèse des protéines. Les 29 articles, pour la plupart, se rapportent à l'incorporation *in vitro* des acides aminés dans les différentes protéines, aussi bien dans les microsomes du foie de rat ou de cobaye que dans les ribosomes d'*Escherichia coli*. D'autres articles concernent des études de structure et de métabolisme des acides ribonucléiques (ARN) en particulier de l'ARN soluble. Quelques exposés enfin sont relatifs à l'étude des analogues pyrimidiques, certains inhibant l'incorporation des acides aminés dans l'ARN soluble ; certains, par contre, comme le 5-fluorouracile, permettent une synthèse d'enzymes « modifiées » et sont incorporés très vite dans une fraction d'ARN distincte de l'ARN soluble et de l'ARN des ribosomes, cet ARN semblant jouer un rôle dans la structure primaire des protéines spécifiques solubles. Tout cet ensemble est une heureuse mise au point d'un problème aussi mouvant que celui de la biosynthèse des protéines.

B. H.